



PROGRAMA DE DOCTORADO

MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA

**DETERMINACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS
Y MOLECULARES CON IMPLICACIÓN
DIAGNÓSTICA, PRONÓSTICA Y TERAPÉUTICA
EN EL CÁNCER DE VEJIGA**

DAVID ALEJANDRO MARTÍN WAY

DIRECTORES DE TESIS:

María Jesús Álvarez Cubero

José Manuel Cózar Olmo



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: David Alejandro Martín Way
ISBN: 978-84-1117-879-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82225>

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	9
RESUMEN/ABSTRACT.....	11
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	19
1.1. Epidemiología.....	19
1.2. Factores etiológicos.....	19
1.3. Diagnóstico.....	22
- Cribado.....	23
- Pruebas de orina.....	23
- Estudios de imagen.....	24
- Cistoscopia.....	24
- Marcadores urinarios.....	24
1.4. Estadificación y predicción del riesgo de recidiva y progresión.....	26
1.5. Biomarcadores en cáncer de vejiga.....	29
- Biomarcadores moleculares.....	31
o Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs).....	31
▪ Generalidades.....	31
▪ SNPs en el cáncer de vejiga.....	33
▪ SNPs en genes antioxidantes y detoxificantes.....	34
▪ SNPs seleccionados.....	35
o MicroRNAs (miRNAs).....	38
▪ MicroRNAs y cáncer.....	38
▪ MicroRNAs y cáncer vesical.....	39
1.6. Exposición ambiental a contaminantes orgánicos.....	40

2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
2.1.	Objetivo principal.....	43
2.2.	Objetivos secundarios.....	43
2.3.	Objetivos futuros.....	44
3.	METODOLOGÍA.....	45
3.1.	Población de estudio.....	45
3.2.	Aspectos éticos.....	46
3.3.	Estudio SNPs seleccionados.....	47
-	Extracción de DNA.....	47
-	Genotipado con sondas TaqMan.....	48
3.4.	Análisis de aislamiento y expresión de miRNAs.....	53
-	Extracción de RNA.....	53
-	Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	53
o	Retrotranscripción.....	53
o	Amplificación por qPCR.....	55
3.5.	Análisis de contaminantes orgánicos en orina.....	57
-	Determinación del contenido total de los compuestos químicos seleccionados en orina.....	57
-	Análisis GC-MS.....	58
3.6.	Análisis estadístico.....	58
4.	RESULTADOS.....	61
4.1.	Características generales de la población de estudio.....	61
4.2.	Estadificación clínica de los pacientes con cáncer vesical.....	63
4.3.	Asociación de SNPs y miRNAs con cáncer de vejiga.....	64
4.4.	Interacciones funcionales entre los genes estudiados.....	73
4.5.	Niveles urinarios de contaminantes orgánicos.....	74

4.6.	Asociaciones entre factores sociodemográficos, exposiciones químicas, estilos de vida y cáncer de vejiga.....	74
5.	DISCUSIÓN.....	77
6.	CONCLUSIONES.....	83
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

ANEXOS

-	Anexo 1. Material suplementario.....	101
-	Anexo 2. Cuestionario estilos de vida.....	113
-	Anexo 3. Método extracción RNA.....	117

AGRADECIMIENTOS:

A mi directora, María Jesús Álvarez, por su inmenso compromiso desde el principio con este proyecto y por animarme siempre a conseguir finalizarlo; por su confianza, enseñanzas y consejos durante la elaboración de esta tesis, descubriéndome una nueva visión muy interesante de la urooncología desde el punto de vista genético.

A mi director, José Manuel Cózar, por todo su apoyo y enseñanzas desde que comencé mi residencia en el servicio de Urología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada, por ser el que me introdujo en este proyecto, y por transmitirme siempre la importancia de la investigación en nuestra profesión.

Al Dr. Ignacio Puche, por ser para mí un referente en investigación, y por su incalculable ayuda en prácticamente todos los proyectos que he desarrollado desde mi residencia, incluida esta tesis.

A las Dras. Alba Tamayo y Rocío Barrabino, por su increíble ayuda para realizar el trabajo de campo y hacer la recogida de datos.

A mis compañeros y amigos urólogos de los servicios de urología de los hospitales Virgen de la Nieves de Granada, Torrecárdenas de Almería y Universitario de Fuenlabrada, por su apoyo y ayuda inestimable a lo largo de todos estos años.

Finalmente, a mi familia, en especial a mis padres y a mi pareja, por su apoyo a lo largo de mi carrera y su confianza día a día; y por su cariño y amor, que son el motor que me impulsa para continuar creciendo como profesional.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA:

Los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en la revista “*Science of the total environment*”, indexada en *Journal Citation Reports* en la categoría de *Environmental science* en la posición 26 de 279 según su ranking en el área, situada en un decil 1 (IF:10.754, año 2021). Se adjunta a continuación la cita:

Martin-Way D, Puche-Sanz I, Cozar JM, Zafra-Gomez A, Gomez-Regalado MDC, Morales-Alvarez CM, Hernandez AF, Martinez-Gonzalez LJ, Alvarez-Cubero MJ. Genetic variants of antioxidant enzymes and environmental exposures as molecular biomarkers associated with the risk and aggressiveness of bladder cancer. *Sci Total Environ.* 2022 Oct 15;843:156965. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156965. Epub 2022 Jun 25. PMID: 35764155.

RESUMEN/ABSTRACT:

❖ Introducción:

El cáncer vesical es el séptimo cáncer más frecuentemente diagnosticado en varones a nivel mundial, y el décimo si consideramos ambos sexos. Entre sus principales factores de riesgo encontramos factores genéticos y ambientales (como el tabaco o la exposición a aminas e hidrocarburos aromáticos).

La cistoscopia continúa siendo la prueba estándar para el diagnóstico y el seguimiento del cáncer de vejiga. Con el propósito de contar con una prueba no invasiva, de utilidad pronóstica y alta precisión diagnóstica, se han intentado desarrollar marcadores que permitan la detección de alteraciones en la expresión génica y a nivel cromosómico, como el Survivin o el UroVysion. Sin embargo, la especificidad de estas pruebas continúa siendo inferior a la de las pruebas estándar, lo que no ha permitido que se sustituya a las pruebas convencionales como herramienta diagnóstica y su utilidad en el pronóstico aún se investiga.

El desarrollo de la secuenciación genómica ha permitido a numerosos estudios de asociación del genoma completo establecer mutaciones genéticas relacionadas con el cáncer vesical, principalmente polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Por otro lado, se ha publicado la presencia de desregulaciones de micro-RNAs en sangre, orina y tejido de tumores vesicales músculo y no músculo invasivos en pacientes con cáncer de vejiga; es por ello que algunos micro-RNAs urinarios se han propuesto como posibles biomarcadores en el diagnóstico de este cáncer. El objetivo de nuestro estudio es evaluar

el papel dichos factores genéticos y el de la exposición ambiental para identificar potenciales biomarcadores no invasivos del cáncer de vejiga.

❖ **Material y métodos:**

En este estudio de casos-controles realizamos un análisis molecular a 99 pacientes con cáncer de vejiga y 125 controles. En todos ellos se tomaron muestras de hisopado bucales para evaluar la presencia de SNPs en 11 genes codificantes de enzimas detoxificantes xenobióticas, e implicados en las defensas celulares antioxidantes y la síntesis y señalización hormonal: *NAT2* (rs1801280), *GPXI* (rs1050450 and rs17650792), *TXNRD1* (rs7310505), *PRDX3* (rs3740562), *PONI* (rs662), *SOD1* (rs10432782), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs1001179), *CYP17A1* (rs743572) y *ESR1* (rs746432). Además, todos los participantes en el estudio completaron un cuestionario de exposición ambiental y estilos de vida.

En un subgrupo de 42 sujetos (17 pacientes y 25 controles) se recogieron muestras de orina para determinación de miRNAs (miR-93-5p, miR-221-3p, miR-126, miR-27a-3p, miR-193b y miR-193a-5p) y análisis de contaminantes ambientales (benzopireno, naftaleno, bisfenol A y etilparabeno).

❖ **Resultados y conclusiones:**

Los SNPs *CYP17A1* (rs743572), *CAT* (rs1001179) y *SOD1* (rs10432782) se asociaron significativamente con el riesgo de padecer cáncer vesical. Además, los portadores de genotipo *NAT*CC tuvieron menor probabilidad de tener tumores múltiples, y los portadores del genotipo *SOD2* AA tuvieron un mayor riesgo de tener tumores de

alto grado, mientras que los portadores del genotipo *ESR1* GG tuvieron un menor riesgo de presentar dicho grado tumoral. Los portadores de *SOD2* presentaron menor probabilidad de tener un tumor Ta de bajo grado.

Por otra parte, existe una mayor expresión de miR-126, miR193-b, miR-27a y miRNA 93-5p en orina de pacientes con cáncer de vejiga respecto a controles. hsa-miR-93-5p se relacionó con *ESR1* y hsa-miR-221-3p se asoció con *SOD2* y *ESR1*. Los resultados sugieren que miR-27a se asocia con miR-193b y que *SOD2* (miR-93-5p y miR193b), *GPXI* (miR-221-3p) y *NAT2* (miR-27a) son biomarcadores que merecería la pena combinar en futuros estudios.

Se encontraron niveles significativamente mayores de benzopireno y bisfenol A en pacientes con cáncer de vejiga respecto a los controles. Los varones presentaron niveles significativamente mayores de naltaleno que las mujeres. Además, los portadores de *PONI* y *CYP17A1* presentaron mayores valores significativamente de bisfenol A y benzopireno respectivamente. Así, se combina información sobre variantes genéticas de enzimas xenobióticas metabolizantes y enzimas antioxidantes con biomarcadores de exposiciones a químicos por primera vez en un mismo estudio.

Finalmente la edad se asoció con un riesgo aumentado de padecer un cáncer vesical de alto grado y una menor probabilidad de que se tratara de un Ta de bajo grado. Los consumidores de alcohol tuvieron menos riesgo de metástasis. Los pacientes expuestos a polvo tuvieron menor riesgo de tener un tumor superficial, mientras que la realización de ejercicio físico regular se asoció a una mayor probabilidad de padecer un Ta de bajo grado frente a otros estadios tumorales más agresivos. El consumo de dietas ricas en lípidos se asoció a una menor probabilidad de tener un tumor superficial.

Todos estos datos abren un nuevo escenario sobre el uso de biomarcadores no invasivos en el diagnóstico y la estadificación del cáncer de vejiga, lo cual, en la práctica clínica habitual, se ha vuelto una necesidad urgente junto con el desarrollo de la medicina personalizada y de precisión.

ABREVIATURAS:

<i>ADAM9</i>	Dominio 9 de la metalopeptidasa ADAM
AEU	Asociación Europea de Urología
BaP	Benzopireno
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BPA	Bisfenol A
<i>BRAF</i>	Serina/treonina quinase B-Raf
<i>BTG2</i>	Factor 2 de antiproliferación BTG
<i>CAT</i>	Catalasas
CaV	Cáncer vesical
<i>CDH1</i>	Caderina 1
CTCs	Células tumorales circulantes
CUETO	Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico
<i>CYP17A1</i>	Citocromo P450 17A1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
DNAf	DNA libre
<i>EGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
EPB	Etilparabeno
<i>FGFR3</i>	Receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico
<i>GATA 3</i>	proteína GATA-ligando 3
<i>GPXI, GPX4</i>	Glutación peroxidasa 1 y 4

<i>GSTM1</i>	Genotipo nulo en la glutatión-S-transferasa Mu 1
GUCG	Genito-Urinary Cancer Group
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
<i>HRAS</i>	Proto-oncogén HRas
<i>IDH1, IDH2</i>	Isocitrato deshidrogenasa 1 y 2
<i>JAK/STAT</i>	Janus quinasa y del transductor de señales y activador de la transcripción
lncRNA	RNA largos no codificantes
mRNA	RNA mensajeros
miRNAs	Micro-RNAs
<i>NAT2</i>	Gen de la N-acetiltransferasa 2
NBI	Imagen de banda estrecha
<i>NCOR1</i>	Correpresor del receptor nuclear 1
<i>NF-κB</i>	Factor nuclear kappa B
NPh	Naftaleno
OR	Odds ratio
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCA3	Antígeno 3 del cáncer de próstata
PD-1	Marcador de muerte programada 1
PD-L1	Ligando del PD-1
PDD	Diagnóstico fotodinámico
<i>PIK3CA</i>	Subunidad alfa de la quinasa catalítica fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3
<i>PON1</i>	Paraoxonase-1
<i>PRDX3</i>	Peroxirredoxina 3

<i>PTEN/MMAC</i>	Gen de la fosfatasa y el homólogo de la tensión
<i>Rb o RBI</i>	Proteína asociada al retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTU-v	Resección transuretral de vejiga
SNPs	Polimorfismos de nucleótido simple
<i>SOD1, SOD2</i>	Superóxido dismutasas 1 y 2
<i>TERT</i>	Telomerasa transcriptasa inversa
<i>TP53</i>	Proteína tumoral P53
<i>TXNRD1</i>	Tiorredoxina reductasa 1
uroTAC	Urografía mediante tomografía computerizada
<i>XOR</i>	Xantina óxido-reductasa
WHO	World Health Organization

1. **INTRODUCCIÓN:**

1.1. **Epidemiología:**

El cáncer vesical (CaV) es el séptimo cáncer más comúnmente diagnosticado en varones a nivel mundial, y el décimo si consideramos ambos sexos. Presenta una tasa de incidencia de 9.5 y 2.4 casos por cada 100000 habitantes-año en varones y mujeres respectivamente, y una tasa de mortalidad de 3.3 hombres y 0.86 mujeres por cada 100000 habitantes-año, según datos obtenidos en 2020 [1].

Su incidencia y mortalidad varían de un país a otro por la diferencia en la exposición a factores de riesgo, las técnicas diagnósticas y los tratamientos disponibles [2]. En Europa, la tasa de incidencia estandarizada por edad es de 20 por cada 100000 habitantes-año para varones y 4.6 para mujeres [1]. A su vez, en España el cáncer vesical representa el cuarto tumor en frecuencia en varones y el quinto en ambos sexos [3]. Más concretamente, en 2011 en Andalucía, su incidencia era de 23.5 casos nuevos por cada 100000 habitantes-años en general, y de 39.73 y 6.06 en varones y mujeres respectivamente [4].

1.2. **Factores etiológicos:**

El tabaco es el factor de riesgo más importante, estando presente en un 50% de los casos. Su humo contiene aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos policíclicos, que se excretan por vía urinaria [2]. En general, existe una probabilidad de 2 a 6 veces mayor de desarrollar cáncer urotelial ante el tabaquismo, y la intensidad y duración de

dicho hábito están directamente asociadas con el riesgo elevado, sin encontrarse un nivel de estabilidad claro [5, 6].

La exposición laboral a aminas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos clorados es el segundo factor de riesgo en importancia, estando presente en un 10% de los casos. Suele ocurrir en industrias de pinturas, tintes, metales y derivados del petróleo [2]. La activación de estas aminas permite su unión al DNA, lo cual ocurre por el efecto de ciertas enzimas (N-acetiltransferasa 2 y glutatión-S-transferasa) que están selectivamente expresadas en la población [7].

La predisposición genética también influye en la incidencia del CaV, fundamentalmente porque favorece la susceptibilidad a los demás factores de riesgo, al igual que otros factores como el hábito tabáquico e historial familiar previo. Los principales genes en los que se han descrito mutaciones relacionadas con este cáncer son: el proto-oncogen HRas (*HRAS*), la proteína asociada al retinoblastoma (*Rb* o *RBI*), gen de la fosfatasa y el homólogo de la tensión (*PTEN/MMAC*), gen de la N-acetiltransferasa 2 (*NAT2*) y genotipo nulo en la glutatión-S-transferasa Mu 1 (*GSTMI*). También se han descrito mutaciones específicas en los genes del receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (*FGFR3*) y los protooncogenes *RAS* para el tipo no músculo-invasivo; y mutaciones en la proteína tumoral P53 (*TP53*), la subunidad alfa de la quinasa catalítica fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3 (*PIK3CA*), *RBI* y *PTEN*, para el músculo-invasivo. Recientemente, se ha destacado el papel relevante de la telomerasa transcriptasa inversa (*TERT*) con casos de mayor severidad de este cáncer, asociándolo también a una alteración de la actividad telomérica. Del mismo modo, se ha descrito la presencia de células tumorales circulantes (CTCs) en el 30% de los pacientes con CaV que se diagnostican en estadios no metastásicos, mostrando una peor progresión global de supervivencia en pacientes cuyo número de CTCs es más elevado [8, 9, 10].

La biopsia líquida se señala como una herramienta prometedora en el screening de esta patología. De forma general, la biopsia líquida busca, cuantifica y caracteriza las células tumorales, el DNA de sus núcleos o fragmentos de ese DNA en la sangre circulante de individuos con tumores, con el objetivo de diagnosticar el cáncer en el estadio más precoz posible y de monitorizar la evolución de la enfermedad. Así miRNAs (micro-RNA) libres en plasma como miR-214 ó miR-155, se usan como biomarcadores diagnósticos; y la detección de mutaciones clave de CaV como mutaciones somáticas en los genes de la serina/treonina quinase B-Raf (*BRAF*), el protooncogen *KRAS*, del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), de la isocitrato deshidrogenasa 1 y 2, (*IDH1*, *IDH2*), *PTEN*, *PIK3CA*, *NRAS* y *TP53* se han encontrado como fuente de DNaf (DNA libre) en muestras de estos pacientes [11, 12].

Por otro lado, los tumores uroteliales vesicales expresan el marcador de muerte programada 1 (PD-1) y su ligando (PD-L1), lo que les facilita a las células tumorales evadir la vigilancia y erradicación por parte del sistema inmune. Así, en los últimos años se están llevando a cabo múltiples estudios que están evaluando la respuesta de estos tumores en estadio metastásico a fármacos que bloquean el PD-1/PD-L1. Destaca el ensayo clínico CheckMate 032 (NCT01928394), que concluye que el nivolumab en monoterapia es un tratamiento seguro y que proporciona una respuesta clínica duradera y significativa en pacientes con cáncer urotelial avanzado, y que la tasa de respuesta objetiva es mayor en aquellos pacientes con mayor expresión del PD-1/PD-L1 [13]. Sin embargo, la tasa de respuesta en dichos pacientes es menor al 50%, lo que nos insta a buscar biomarcadores predictivos de respuesta [14]. De forma similar, recientemente se ha aprobado el uso de pembrolizumab y atezolizumab para el tratamiento del CaV metastásico en pacientes no candidatos a platinos, y la Asociación Europea de Urología (AEU) recomienda la determinación de la expresión de PD-L1 en los pacientes candidatos

a estas terapias, aunque con un grado de recomendación débil dado que aún existen limitaciones debidas a que un porcentaje de pacientes con baja expresión de PD-L1 responden a estos tratamientos [15].

La exposición a radiación ionizante también eleva el riesgo de estos tumores, así como los tratamientos con ciclofosfamida, la esquistosomiasis (que predispone específicamente al CaV de tipo escamoso) [2]. En cuanto a la influencia de factores nutricionales, en general, una dieta mediterránea se relaciona con un menor riesgo de cáncer urotelial [16]. Por otro lado, aunque parece razonable que la ingesta reducida de líquidos pueda relacionarse con un mayor riesgo de desarrollar CaV por la mayor concentración de carcinógenos en orina, los estudios realizados a este respecto arrojan datos contradictorios [17].

1.3. Diagnóstico:

El propósito del diagnóstico para el CaV pretende detectar la enfermedad en sus etapas más tempranas e identificar oportunamente los tumores que tengan probabilidad de convertirse en invasivos de músculo. De manera general, ante la sospecha de CaV se deben realizar pruebas de orina que detecten la hematuria, el principal síntoma de la enfermedad, complementadas con estudios de imagen que detecten la presencia de lesiones intravesicales. Si los resultados de los estudios de imagen son normales y la sospecha clínica de tumor vesical persiste, está indicado realizar una cistoscopia [18].

- Cribado:

Pese a que el CaV presenta altas tasas de incidencia y prevalencia, siendo un importante problema de salud, no existen estudios que apoyen la implementación de pruebas de cribado para esta enfermedad. Esto es debido a que los métodos de tamizaje propuestos, como la tira reactiva de orina, presentaron valores predictivos positivos demasiado bajos, cuya calidad no permite una estrategia de cribado confiable [8].

- Pruebas de orina:

Como primera medida para el diagnóstico, un sencillo análisis de orina permite detectar la hematuria. Considerando que este síntoma suele presentarse de forma intermitente, es recomendable realizar análisis seriados para aumentar la sensibilidad de la prueba.

En segundo lugar, la citología urinaria proporciona una interpretación de los posibles cambios morfológicos que presentan las células uroteliales. Constituye una herramienta muy útil para el diagnóstico y seguimiento de este cáncer, pues tiene una alta sensibilidad y especificidad para los tumores de alto grado (mayor del 90%); sin embargo, para los tumores de bajo grado resulta muy baja (30-65%), por lo que un resultado negativo no descarta un tumor de este tipo [18]. Además, la interpretación de la citología es operador-dependiente, y los resultados pueden verse alterados en casos de bajo recuento celular en la muestra, infecciones del tracto urinario, la presencia de litiasis, ... Sin embargo, si se realiza por una persona con experiencia, la especificidad de esta prueba supera el 90% [19,20,21].

- Estudios de imagen:

La urografía mediante tomografía computerizada (uroTAC) es la técnica gold estándar para detectar tumores papilares en el tracto urinario, que se evidencian como defectos de replección y/o hidronefrosis [22]. Otras alternativas si la prueba anterior no está disponible son la ecografía o la urografía intravenosa convencional.

- Cistoscopia:

La cistoscopia con luz blanca es la prueba estándar para el diagnóstico del CaV. Hace posible una visualización directa del urotelio para realizar una descripción detallada de las características del tumor, como su apariencia, número, tamaño, localización y tipo de base (pediculada o sésil), así como las anomalías presentes en la mucosa. Sin embargo, esta técnica no permite una completa detección de algunas lesiones planas o lesiones papilares pequeñas. Esto hizo que se desarrollase el diagnóstico fotodinámico (PDD), un tipo de cistoscopia de fluorescencia que logra reconocer el tejido vesical maligno basado en sus diferencias metabólicas con respecto al tejido sano, lo que representa una mejora significativa en la precisión de la prueba. Otra técnica diagnóstica es la imagen de banda estrecha (NBI), que se vale únicamente de los espectros azul y verde de la luz para lograr un mejor contraste de la mucosa y la microvasculatura vesical, y por tanto una mayor sensibilidad diagnóstica [19,23].

- Marcadores urinarios:

Con el propósito de contar con una prueba no invasiva, de utilidad pronóstica y alta precisión diagnóstica, se han intentado desarrollar estrategias para utilizar algunas

moléculas asociadas a tumores vesicales. Es el caso de marcadores que permitan la detección de alteraciones en la expresión génica y a nivel cromosómico que faciliten el diagnóstico del CaV. Algunas de estas estrategias utilizan antígenos tumorales de vejiga (BTA-stat, BTA-trak), proteínas presentes en procesos cancerosos (NMP-22, BLCA-4, Survivin), técnicas de citología cuantitativa como Quanticyt, análisis del gen FGFR3 y detección de aneuploidías por FISH como UroVysion, entre otras; alcanzando incluso una sensibilidad mayor que la obtenida por la citología o la cistoscopia. Sin embargo, la especificidad de estas pruebas continúa siendo inferior, lo que no ha permitido que se sustituya a las pruebas convencionales como herramienta diagnóstica y su utilidad en el pronóstico aún se investiga [19, 24, 25].

Siendo el objetivo evitar la realización de cistoscopias innecesarias, en lugar de buscar marcadores con una alta sensibilidad y especificidad, deberíamos buscar uno con un alto valor predictivo negativo, ya que un test capaz de predecir la ausencia de tumor tendría gran utilidad en la actividad clínica diaria [26].

Estableciendo un paralelismo con el cáncer de próstata, para dicho cáncer también existe la necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores que sean más específicos que el PSA y que sean capaces de identificar pacientes afectados, y en concreto con cáncer de próstata clínicamente significativo. Para desarrollar estos biomarcadores ha sido fundamental en el hecho de que las células cancerosas prostáticas pueden secretar sustancias a la orina o desprenderse en los fluidos prostáticos tras una manipulación rectal de la próstata, pudiendo ser detectadas en la suero u orina. Así, entre los principales biomarcadores urinarios establecidos encontramos, entre otros, el PCA3 (antígeno 3 del cáncer de próstata) y el SelectMDx. Hay evidencia que, utilizando estos biomarcadores, se puede reducir el número de biopsias innecesarias y con ello todas las complicaciones derivadas de las mismas. Sin embargo, los estudios al respecto presentan limitaciones,

como el hecho de que la mayoría no describieran el papel establecido de la resonancia magnética en la toma de decisiones, y es por ello que la AEU solo recomienda el uso de estos marcadores en pacientes asintomáticos en un grado débil [27,28].

1.4. Estadificación y predicción del riesgo de recidiva y progresión:

Según la última clasificación TNM de 2017 [29], los tumores papilares confinados a la mucosa o que invaden la lámina propia se clasifican como Ta y T1 respectivamente. Los tumores planos de alto grado confinados a la mucosa se denominan Cis (Tis). Dichos tipos tumorales se clasifican como tumores no músculo-invasivos, que además, pueden clasificarse siguiendo la clasificación de 2004 de la World Health Organization (WHO) [30] según su grado histológico en papilomas uroteliales, neoplasias papilares de potencial maligno bajo, carcinomas papilares de bajo grado y de alto grado; o bien puede utilizarse la misma clasificación de 1973 para clasificarlos en bien, moderadamente o pobremente diferenciados (G1, G2 y G3 respectivamente) (Figura 1). Por otro lado, los tumores que infiltran la túnica muscular vesical (T2a y b) se denominan músculo-invasivos.

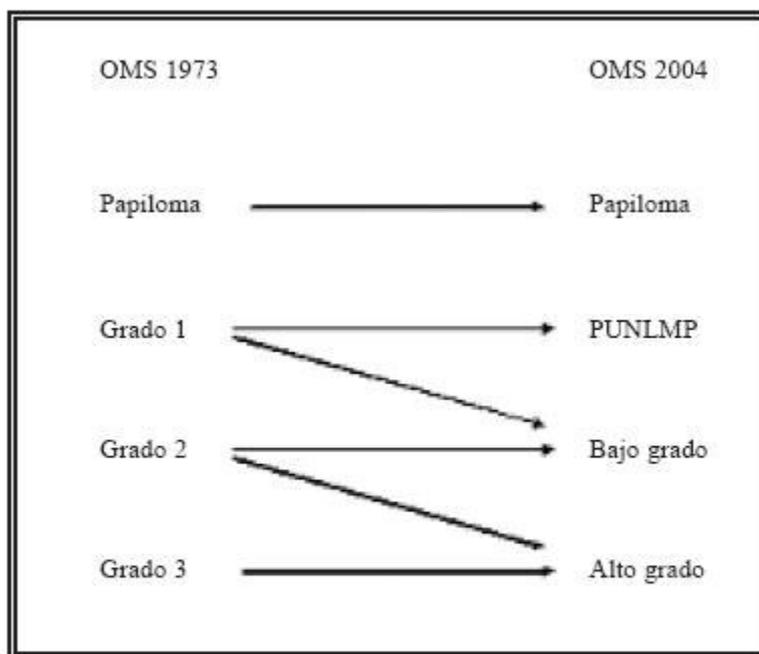


FIGURA 1. Relación entre la clasificación OMS de 1973 y la clasificación OMS de 2004 de los tumores uroteliales papilares.

Según dichas clasificaciones, el riesgo de recidiva y progresión de los carcinomas uroteliales varía. Así, los Ta de bajo grado tienen una tasa de recidiva del 50-70% y progresan en alrededor del 5% de los casos, mientras que las lesiones T1 de alto grado recidivan en más del 80% de los casos y progresan en el 80% de los pacientes en los tres primeros años [31]. Pero el pronóstico de estos tumores se relaciona también con el tamaño del tumor, la multiplicidad, la configuración papilar o sésil, la presencia o ausencia de invasión linfovascular y el estado del urotelio restante [32,33].

Para establecer a corto y largo plazo el riesgo de recurrencia y progresión en cada paciente, y así poder decidir el mejor tratamiento a seguir, se han desarrollado a lo largo de los años distintos modelos pronósticos, como el del Club Urológico Español de Tratamiento Oncológico (CUETO) para pacientes tratados con BCG (bacilo de Calmette-Guérin) [34]. Por otro lado, la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) y Genito-Urinary Cancer Group (GUCG) también desarrolló un sistema

de puntuación y tablas [35] de uso ampliamente extendido, aunque presenta un bajo valor predictivo positivo [36], lo que hace que se establezca la necesidad de incorporar a dichas tablas nuevos marcadores moleculares. Además, dichos grupos determinan con qué frecuencia hay que realizar citologías de orina y cistoscopias en los distintos grupos de riesgo para el seguimiento tras la resección transuretral de vejiga (RTU-v); al ser las cistoscopias procedimientos invasivos no libres de complicaciones, el uso de marcadores genéticos (como *PTEN*, *FGFR3* y *GSTMI*) con valores altos de sensibilidad y especificidad, así como una detallada caracterización de los componentes de la biopsia líquida (DNAf, RNAf, CTCs y exosomas) en estos algoritmos de seguimiento podría reducir el número de cistoscopias a realizar.

En la actualidad, la AEU recomienda clasificar a los pacientes diagnosticados por primera vez de CaV no músculo-invasivo en cuatro grupos de riesgo, según un modelo pronóstico propio (Tabla 1) [37].

Tabla 1: grupos de riesgo de los CaV no músculo-invasivos según la AEU.

GRUPO DE RIESGO	
BAJO	Tumor primario, único, TaT1 G1/bajo grado, menor de 3cm de diámetro, sin Cis, en un paciente de 70 años o menor.
	Tumor primario Ta G1/bajo grado, sin Cis, con un factor de riesgo adicional como máximo.
INTERMEDIO	Pacientes sin Cis que no se pueden catalogar como de bajo, alto o muy alto riesgo.
ALTO	Todos los T1 G3/alto grado sin Cis, excepto aquellos incluidos en el muy alto riesgo. Todos los Cis, excepto aquellos incluidos en el muy alto riesgo.
	Estadio, grado y factores de riesgo adicionales: - Ta G2/bajo grado o T1G1 sin cis, con los 3 factores de riesgo. - Ta G3/alto grado o T1 de bajo grado sin Cis, con al menos 2 factores de riesgo. - T1G2 sin Cis con al menos un factor de riesgo.
MUY ALTO	Estadio, grado y factores de riesgo adicionales: - Ta G3/alto grado y Cis con los 3 factores de riesgo. - T1G2 y Cis con al menos 2 factores de riesgo. - T1 G3/alto grado y Cis con al menos un factor de riesgo. - T1 G3/alto grado sin Cis con los 3 factores de riesgo.

FACTORES DE RIESGO ADICIONALES:
 - Edad mayor a 70.
 - Tumores papilares múltiples.
 - Tumores de 3cm de diámetro o más

Respecto a los tumores músculo-invasivos, un 50% de los pacientes presentarán metástasis a distancia tras ser tratados mediante cistectomía radical. Además, un 3-10% de los tumores vesicales diagnosticados serán metastásicos de inicio [38]. Para confirmar la presencia de metástasis ganglionares y viscerales tanto al diagnóstico inicial de un CaV músculo-invasivo como en el seguimiento tras la cistectomía radical, la prueba de elección es el TAC toraco-abdomino-pélvico según las Guías clínicas de la AEU [39]. Sin embargo, presenta algunas limitaciones, como su baja sensibilidad y especificidad para diagnosticar metástasis ganglionares; en este contexto surge la necesidad de encontrar nuevos marcadores genéticos en mutaciones germinales y somáticas, así como una clasificación específica del tumor y estadiaje, complementada con los valores moleculares de los componentes de la biopsia líquida, que se complementen con las pruebas de imagen para detectar metástasis tanto antes del tratamiento quirúrgico curativo (o tras un protocolo de órgano-preservación) de los tumores músculo-invasivos, como en su seguimiento tras el mismo.

1.5. Biomarcadores en cáncer de vejiga:

Como ya hemos indicado, la cistoscopia continúa siendo la principal prueba para la detección y seguimiento rutinario de pacientes con CaV. Se trata de un procedimiento costoso, invasivo y doloroso, que convierte a este cáncer en el más caro de tratar y cuya adherencia de los pacientes a la vigilancia es tan baja como el 40%. A su vez la citología urinaria, examen que apoya a la cistoscopia en el seguimiento de la enfermedad, tiene una alta variabilidad inter-observador y una baja sensibilidad en tumores de bajo grado. Este panorama sugiere la necesidad de desarrollar e incorporar una prueba no invasiva,

confiable, precisa, barata y con alto valor predictivo negativo (sensible), para realizar la vigilancia del CaV y apoyar su diagnóstico [40].

En este sentido, se ha planteado la posibilidad de desarrollar biomarcadores genéticos como herramientas que permitan predecir, diagnosticar y vigilar el cáncer vesical. Si bien el tabaco y los carcinógenos ocupacionales constituyen los principales factores de riesgo para la enfermedad, el hecho de que personas expuestas a ambos no resulten afectadas sugiere un rol significativo de la susceptibilidad genética en la carcinogénesis del CaV [41]. El desarrollo de la secuenciación genómica de nueva generación, ha permitido a numerosos estudios de asociación del genoma completo (GWAS) establecer mutaciones genéticas relacionadas con el CaV, principalmente polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). De manera que la utilidad de este tipo de variaciones genéticas como biomarcadores de este cáncer, cobra mayor importancia y representa una interesante alternativa por explorar [42,43]. Además, ya se han descrito numerosos SNPs relacionados con la carcinogénesis de otros tipos tumorales, y se han postulado como biomarcadores relacionados con el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de dichas patologías. Así, por ejemplo, SNPs en los genes del correpresor del receptor nuclear 1 (*NCOR1*), de la proteína GATA-ligando 3 (*GATA3*), de la cadherina 1 (*CDH1*), de la serina/treonina quinasa *ATM* y *AKT 1* y *PTEN* se han asociado con varias vías de desarrollo del cáncer de mama; incluso la expresión de *NCOR1*, *ATM*, y *GATA3* se asoció a mayor supervivencia global y supervivencia libre de progresión, mientras que la sobreexpresión de *CHDI* es predictora de peor pronóstico [44]. Por otro lado, los SNPs *ATM* y de la endonucleasa *ERCCI* se consideran factores de riesgo relacionados con la agresividad del cáncer de próstata [45].

- Biomarcadores moleculares:
 - o Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs):

- Generalidades:

Los SNPs son mutaciones en la secuencia de DNA que afectan las bases nitrogenadas, adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) y constituyen el cambio puntual de un nucleótido por otro (Figura 2). Para ser considerado un polimorfismo, la mutación de dos o más alelos para un mismo locus debe ocurrir con una frecuencia de al menos un 1% en una misma población. Los SNPs representan hasta el 90% de las variaciones en la secuencia de DNA y se encuentran distribuidos cada 100 a 300 bases a lo largo de todo el genoma humano. Las principales características de los SNPs son: se localizan en todo el genoma humano (tanto en zonas codificantes como en no codificantes), son las variantes genéticas más comunes, generalmente son mutaciones bialélicas, gran parte de ellos tienen implicaciones en enfermedades y son fácilmente evaluados por métodos automatizados [46,47].

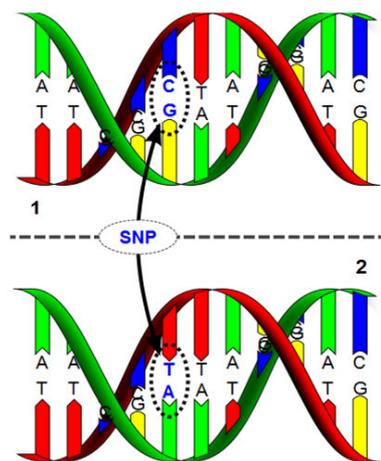


Figura 2: Representación de un SNP.

Imagen tomada de <https://blogdelaboratorio.com/snpedia-una-enciclopedia-de-los-snps/>

De manera general los SNPs se dividen en: neutros sin impacto biológico; y funcionales que afectan diversos procesos y constantemente se asocian a enfermedades. Se pueden clasificar según su localización y el efecto que ejercen: aquellos que se localizan en regiones codificantes pueden ser SNPs sinónimos (sSNP), que involucran un cambio de nucleótido que no altera el aminoácido codificado; o SNPs no sinónimos (nSNP) que modifican el aminoácido codificado por cambios de sentido (bien sea “missense”, “nonsense” o “frameshift”). A su vez los SNPs que se localizan en regiones no codificantes pueden modificar o no procesos de traducción, splicing, unión a factores de transcripción, función de los miRNA) la estabilidad de los RNA mensajeros (mRNA) y la interacción de miRNA/mRNA [47] (Figura 3).



Figura 3: Tipos de SNPs en función de su localización y efecto.

Los SNPs que afectan a las regiones codificantes producen un mayor impacto sobre la salud, pero aún aquellos que no alteran funciones biológicas pueden predisponer al organismo a enfermedades o influir en la respuesta a tratamientos. Ante tal panorama, la investigación sobre SNPs resulta prometedora para la generación de nuevo

conocimiento sobre los mecanismos de muchas enfermedades poligénicas, así como el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de biomarcadores predictivos y de diagnóstico de tipo no invasivo [48,49].

- SNPs en el CaV:

Todos aquellos genes asociados a diversos tipos de cáncer contienen SNPs que pueden ubicarse en exones, intrones, promotores de genes y regiones (UTR) 5' y 3' podrían ser interesantes dianas de estudio en esta patología. Según su localización en el genoma, estas variantes pueden alterar múltiples mecanismos: expresión génica, reparación del DNA, regulación epigenética, ciclo celular, metabolismo e inmunidad; produciendo en muchos casos una susceptibilidad genética al cáncer [50]. En este sentido el cáncer vesical no es la excepción, pues cada vez son más los estudios que describen la relación de factores genéticos con la aparición de este cáncer y más abundante la evidencia de SNPs asociados con la morbilidad, progresión y recurrencia de esta enfermedad [51,52].

Debido a los procesos de almacenamiento y eliminación de orina que ocurren en la vejiga, las células uroteliales se encuentran continuamente expuestas a compuestos que deterioran su DNA. El daño repetido a la integridad celular puede generar una acumulación de mutaciones, que en condiciones normales logran ser reparadas. Sin embargo, ante la presencia de polimorfismos genéticos que alteran los mecanismos celulares, los daños se hacen permanentes y aumentan los riesgos de originar CaV [53]. Hace más de 10 años, Kiemeny y colaboradores (2008) publicaron el primer estudio GWAS descubriendo dos polimorfismos asociados con CaV (rs9642880 y rs710521). Desde entonces son muchos los estudios que han identificado nuevas variantes asociadas

con la predisposición a la enfermedad (Tabla S1), confirmando la importancia de los polimorfismos en su carcinogénesis y desarrollo [52].

- SNPs en genes antioxidantes y detoxificantes:

El metabolismo normal del oxígeno genera una serie de subproductos denominados especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen un estrés oxidativo a las células. Se trata de iones de oxígeno, peróxidos y radicales libres que provocan rupturas del DNA, modifican lípidos y proteínas de membranas, así como daño en mitocondrias. Para revertir estos efectos nocivos, las células cuentan con mecanismos enzimáticos antioxidantes de actividad reductora (superóxido dismutasas, catalasas y glutatión peroxidadas) que alcanzan un equilibrio REDOX entre la generación de ROS que afectan sus estructuras y la capacidad de inhibir estos productos y reparar los daños [54].

Genes antioxidantes como las isoformas de las superóxido dismutasas 1 y 2 (*SOD1*, *SOD2*), catalasa (*CAT*) y la glutatión peroxidasa 1 y 4 (*GPX1*, *GPX4*) codifican estas enzimas que en condiciones normales ejercen una función protectora suficiente para preservar la integridad celular. Sin embargo, estudios demuestran que, ante variaciones genéticas producidas por algunos SNPs, la función reductora de las enzimas antioxidantes puede verse afectada y dar origen a múltiples enfermedades como cardiomiopatías, defectos neuronales, envejecimiento prematuro y varios tipos de cáncer (mama, próstata, pulmón, colon y vejiga) [54,55]. Por ejemplo, los polimorfismos de la *SOD2* se han relacionado con el desarrollo de linfoma no Hodgkin y cáncer de pulmón y colorrectal, postulándose como posibles marcadores de estos tipos de cáncer.

Así mismo, la continua exposición a contaminantes ambientales y productos ocupacionales derivados de aminas aromáticas o colorantes azoicos tiene efectos

cancerígenos en el organismo y puede incrementar el riesgo de CaV. Las consecuencias nocivas del contacto con estas sustancias son prevenidas por la acción de las N-acetiltransferasas. Enzimas codificadas por los genes *NAT1* y *NAT2*, que en condiciones normales tienen una capacidad detoxificante suficiente para metabolizar y eliminar estos productos xenobióticos, así como para el metabolismo e inactivación de fármacos [56]. Hay estudios que sugieren que determinados polimorfismos en estos genes pueden producir un fenotipo de actividad detoxificante más lenta, asociado con un mayor riesgo para CaV [57].

- SNPs seleccionados:

Dada la importancia de los efectos producidos por SNPs en genes involucrados con mecanismos celulares de reparación y su implicación en procesos de carcinogénesis, su estudio genera gran interés y motiva nuevas investigaciones [58]. En ese sentido, surgen expectativas prometedoras para el análisis de SNPs de genes implicados en los procesos antioxidantes y detoxificantes, justamente los encargados de revertir los efectos nocivos de los principales factores exógenos de riesgo para el CaV: el tabaco y los cancerígenos ocupacionales.

Este estudio se centra en una serie de polimorfismos como *GPXI*, tioredoxina reductasa 1 (*TXNRD1*), peroxirredoxina 3 (*PRDX3*), paraoxonase-1, (*PON1*), *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *NAT2*, citocromo P450 17A1 (*CYP17A1*) y del receptor estrogénico 1 (*ESR1*), tomando como referencia un trabajo previo de este grupo de investigación sobre enzimas xenobióticas en cáncer de próstata [59]. La mayoría de dichos polimorfismos forman parte de las defensas antioxidantes celulares contra moléculas reactivas generadas fundamentalmente por exposición ambiental. Además, algunas de ellas han sido descritas

como posibles marcadores pronósticos en cánceres de colon, pulmón, vejiga y ovario, como *SOD*, *CAT* y *XOR* (xantina óxido-reductasa) [60].

Hacemos un repaso más concreto de cada uno de ellos, y además añadimos una tabla resumen al material suplementario (Tabla S2), así como la Figura 4:

- *NAT 2*: este gen codifica una enzima de fase II de biotransformación que actúa en la detoxificación de xenobióticos que contienen aminas aromáticas. Los “acetiladores lentos” se han asociado al CaV, además de que la interacción de esta variante con el humo del tabaco es un factor de riesgo bien conocido para dicho cáncer [61].
- *SOD1*: enzima antioxidante que, en asociación con factores ambientales se ha asociado a mayores tasas en el riesgo de padecer CaV [62].
- *PONI*: una baja concentración plasmática y baja actividad de esta enzima se han descrito en pacientes con CaV. Además, los niveles plasmáticos bajos se han propuesto como un marcador de alta sensibilidad para detectar recidiva tumoral [63].
- *PRDXs*: son efectores involucrados en la protección celular contra el estrés oxidativo, y juegan un papel importante en la aparición y desarrollo de carcinomas, incluyendo el CaV [64].

- *ESR1*: codifica el receptor estrogénico alfa, y se ha implicado en el desarrollo de tumores vesicales, más aún en aquellos de alto grado [65]. Además, puede modular la expresión de enzimas antioxidantes [66].
- *CYP17A1*: enzima de una importancia capital que cataliza la formación de andrógenos endógenos. Ha sido estudiada en cáncer de próstata, pero no en otros tumores urológicos, como el CaV [67].

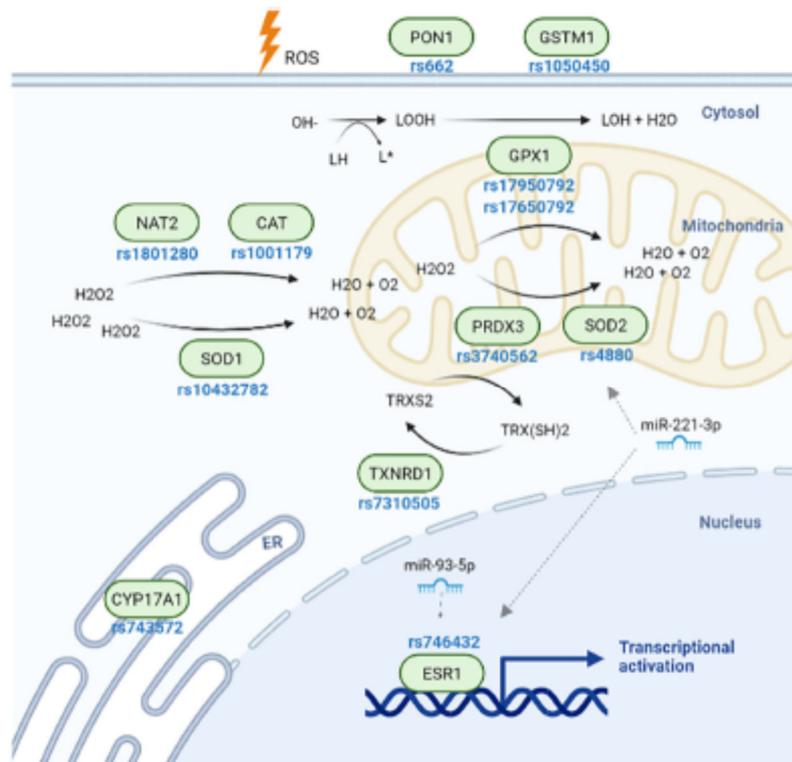


Figura 4: resumen de SNPs codificantes de enzimas antioxidantes, enzimas metabolizantes xenobióticas y síntesis hormonal y vías de señalización en relación al CaV a un nivel molecular. También se representan los miRNAs que interaccionan a nivel molecular con los SNPs seleccionados para CaV.

- MicroRNAs (miRNAs):

Los miRNAs son RNAs no codificantes de pequeño tamaño, de unos 22 nucleótidos de tamaño, que juegan un papel significativo en la regulación génica [68]. Los miRNAs se relacionan aproximadamente con un 60% de los genes codificantes de proteínas, y se han descrito más de 2000 (Figura 5). Se ha descubierto su gran habilidad en la regulación de la expresión de un tercio de los genes del genoma humano [69, 70].

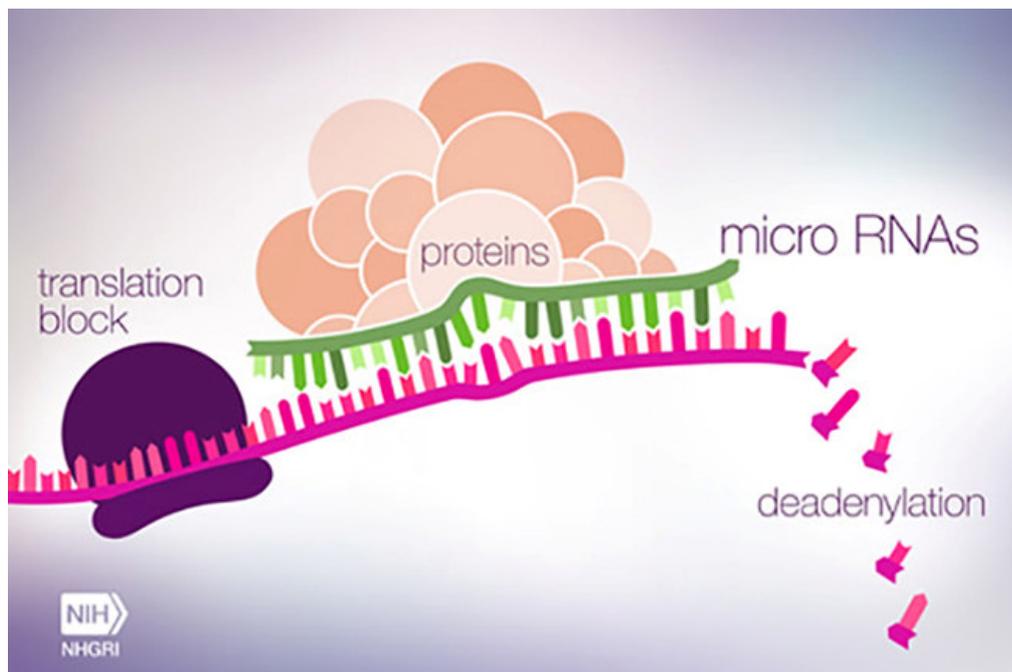


Figura 5: Representación de miRNA. Imagen sacada de <https://www.genengnews.com/topics/omics/microrna-expression-could-be-key-to-leukemia-treatment/>

- MicroRNAs y cáncer:

En 2002, se estableció la asociación entre la leucemia linfática crónica y la baja expresión y delección de miR-15 y miR-16, sugiriéndose así por primera vez el papel de

los miRNAs en la progresión del cáncer. Desde entonces, los miRNAs se han relacionado con prácticamente todos los procesos involucrados en el desarrollo y progresión de tumores; algunos influyen negativamente sobre oncogenes codificantes de proteínas, mientras que otros pueden inhibir supresores de tumores, pudiendo actuar por tanto como onco-miRNAs o miRNAs supresores de tumores [71, 72]. De este modo, numerosos artículos han recogido el posible papel como biomarcadores diagnóstico y pronóstico de los miRNAs en distintos tipos de cáncer [73].

Además, la desregulación de los miRNAs se puede asociar a alteraciones en genes implicados en la progresión tumoral, como ocurre en la formación y progresión del cáncer gástrico, en la que hay una sobreexpresión de miR-1269. Respecto a la proliferación celular, el miR-145 puede inhibirla en células de cáncer hepático. Existen también varios miRNAs implicados en la muerte celular programada, especialmente en la apoptosis de células tumorales; así, la baja expresión de miR-192, miR-194 y miR-215 inhabilita la capacidad de apoptosis de las células tumorales en el mieloma múltiple [73]. Por otro lado, la angiogénesis tumoral puede ser controlada por algunos miRNAs, como el miR-210 y el miR-519c [74]. Finalmente, una gran variedad de miRNAs están implicados en el proceso de vigilancia y escape inmune tumoral, tal y como se comprobó con la conexión de miR-574-3p, la expresión de PD-L1 y los niveles de linfocitos infiltrantes de tumor en los cordomas [75].

- MicroRNAs y cáncer vesical:

Se ha publicado la presencia de desregulaciones de miRNAs en sangre, orina y tejido de tumores vesicales músculo y no músculo invasivos en pacientes con CaV. En dichos pacientes se ha observado una expresión aumentada de algunos onco-miRNAs

como miR-141b, miR-200s y miR-205, tanto en sangre periférica, como en orina y tejido tumoral. La sobreexpresión de estos miRNAs favorece el potencial oncogénico en CaV modulando las vías de señalización de *EMT* o *PI3K/AKT*, de la Janus quinasa y del transductor de señales y activador de la transcripción (*JAK/STAT*) y del factor nuclear kappa B (*NF-κB*); por otro lado, la infraexpresión de dichos RNAs se ha observado en tumores de alto grado y en estadios avanzados, en pacientes con peor pronóstico [76].

Así, algunos miRNAs urinarios se han propuesto como posibles biomarcadores en el diagnóstico de CaV [77]. Los carcinomas grado 3 según la WHO muestran hiperregulación del miR-126-3p en plasma extravesical y orina en comparación con controles [78]. Además, la supresión del miR-126 promueve la proliferación, migración e invasión celular en el CaV [79]. Por otro lado, la activación de la expresión del miR-193b-3p, un supresor de tumores bien conocido, originó la inhibición de la parada del ciclo celular, la invasión celular y migración, por lo que se ha asociado al tratamiento y manejo de carcinomas uroteliales [80]. Finalmente, algunos experimentos *in vitro* han mostrado que la sobreexpresión de miR-93-5p puede suprimir la vía del factor 2 de antiproliferación BTG (*BTG2*) y así favorecer la progresión de CaV [81].

1.6. Exposición ambiental a contaminantes orgánicos:

La preocupación acerca de los efectos sobre la salud por la exposición a contaminantes orgánicos ha ido en aumento recientemente. Como ya se comentó en el apartado de factores etiológicos del CaV, la exposición a aminas aromáticas, hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos clorados son el segundo factor de riesgo en importancia tras el tabaco. El benzopireno (BaP) y el naftaleno (NPh) son hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) ampliamente distribuidos en el

medioambiente, y producen efectos tóxicos a través del estrés oxidativo y por metabolitos genotóxicos mediados por el *CYP1A1* [82]. El BaP es uno de los componentes más estudiados del humo del tabaco y sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas están bien establecidas [83]. Además, puede influir en la síntesis de esteroides, por lo que se le considera también un disruptor endocrino [84]. Por otro lado, las mezclas de PAH juegan un papel relevante en el CaV, aunque su efecto parece modulado por polimorfismos en genes codificantes de enzimas metabólicas xenobióticas [85], tal y como ya describimos que ocurre con la N-acetiltransferasa 2 y la glutatión-S-transferasa. Por último, el bisfenol A (BPA) y el etilparabeno (EPB) son disruptores endocrinos químicos usados en plastificantes y productos de higiene personal respectivamente, y pueden inducir cáncer en órganos reproductivos [86].

2. **HIPÓTESIS y OBJETIVOS:**

Se han identificado diversos posibles biomarcadores para el CaV, sin embargo, la especificidad de estas pruebas continúa siendo inferior a las pruebas convencionales. Todo esto no ha permitido que se implanten dichas pruebas como herramienta diagnóstica y su utilidad en el pronóstico aún siga en investigación. Conocemos, que uno de los principales factores etiológicos de este tumor, es la exposición a agentes xenobióticos o tóxicos. Por ello, postulamos que el papel de estas variantes genéticas y los miRNAs relacionados puede ser clave como biomarcadores diagnóstico y agresividad en este tumor. Esto hace plantearnos los siguientes objetivos del trabajo.

2.1. **Objetivo principal:**

Evaluar el papel de diversos factores genéticos (SNPs y miRNAs), y el papel de la exposición ambiental para identificar potenciales biomarcadores no invasivos del CaV.

2.2. **Objetivos secundarios:**

- Analizar el papel de los SNPs en los genes *NAT2* (rs1801280), *GPXI* (rs1050450 y rs17650792), *TXNRD1* (rs7310505), *PRDX3* (rs3740562), *PONI* (rs662), *SOD1* (rs10432782), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs1001179), *CYP17A1* (rs743572) y *ESR1* (rs746432) como biomarcadores de CaV.
- Analizar el papel de los miRNAs libres (miR-93-5p, miR-221-3p, miR-126, miR-27a-3p, miR-193b y miR-193a-5p) como biomarcadores de CaV.

- Correlacionar los compuestos tóxicos encontrados en orina (BaP, NPh, BPA y EPB) con agresividad tumoral y progresión clínica.
- Correlacionar los compuestos tóxicos encontrados en orina (BaP, NPh, BPA y EPB) con agresividad tumoral con el papel de los SNPs en los genes analizados.

2.3. Objetivos futuros:

- Valorar cuál es el mejor marcador no invasivo comparando los estudios moleculares en muestras no invasivas (sangre, orina y saliva) con muestras invasivas (tejido).

3. **METODOLOGÍA:**

3. 1. **Población de estudio:**

La población de estudio corresponde a la población del área sanitaria Norte de Granada, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. La cohorte incluida comprende los siguientes criterios de inclusión: pacientes de entre 18 y 82 años, sometidos a RTU vesical por una sospecha de un tumor urotelial vesical diagnosticado por primera vez. Se excluirán del estudio posteriormente a aquellos pacientes que, tras el estudio anatomopatológico, se confirme que presenta tumores de otro tipo histológico o patología benigna. También se excluyeron los pacientes previamente diagnosticados de otros tumores de otras localizaciones, pacientes no caucásicos y los que no aceptaron su participación en este estudio. Los controles incluidos cumplen los siguientes criterios: personas con similares características sociodemográficas que los pacientes, sin evidencia de patología urológica previa, de la misma área sanitaria, y que no tuvieran historia familiar oncológica previa.

Se incluyeron finalmente en el estudio 99 pacientes diagnosticados de CaV y 125 controles. Se recogieron las siguientes variables clínicas en los pacientes con CaV:

- Antropométricas: edad del paciente, sexo, antecedentes personales y familiares de patología oncológica, principales comorbilidades y cálculo del índice de comorbilidad de Charlson.
- Sintomáticas y pruebas diagnósticas: presencia de hematuria u otra sintomatología al diagnóstico, resultados de la citología de orina, de técnicas de imagen y de cistoscopia.

- Estadía: características histológicas y morfológicas del tumor (TNM, grado histológico según la clasificación WHO 2004/2016, grupo de riesgo de la AEU) y presencia o no de metástasis por pruebas de imagen.
- Seguimiento: tratamientos adyuvantes a la cirugía, aparición o no de recidiva o progresión en caso de los no músculo-invasivos (y tiempo hasta las mismas), aparición o no de metástasis o recidiva local en los músculo-invasivos (y tiempo hasta las mismas), tiempo de seguimiento, supervivencia global, éxitos y motivo del mismo.

Sin embargo, para este trabajo únicamente se analizaron las variables referentes al estadiaje; las variables antropométricas, sintomáticas, diagnósticas y de seguimiento han quedado recogidas para realizar futuros trabajos, como estudios longitudinales.

De todos los pacientes y controles se tomaron muestras de hisopado bucal para los análisis genéticos, muestras que fueron conservadas a -20°C hasta su posterior análisis. Además, los participantes completaron un cuestionario de exposición ambiental y estilos de vida (ANEXO 2). En un subgrupo de 42 sujetos (17 pacientes y 25 controles) se recogieron muestras de orina para determinación de miRNAs y análisis de contaminantes ambientales, muestras almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

3. 2. Aspectos éticos:

El estudio se ha llevado a cabo según la Ley 14/2007 de 3 de julio de Investigaciones Biomédicas, así como siguiendo los preceptos incluidos en el informe Belmont y la Declaración de Helsinki (actualizada en la Asamblea de Brasil en 2013)

para la investigación biomédica. También se tiene en consideración la Ley de Autonomía del paciente 41/2002.

El tratamiento de los datos de carácter personal de los sujetos que participan en el estudio se ajustará a lo establecido en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal, 15/1999 de 13 de Diciembre, informando al paciente de sus derechos ARCO (Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición). Se asegurará el anonimato de los sujetos y confidencialidad de los datos, los cuales no estarán accesibles a personas ajenas al estudio, para ello se disociarán las muestras de los datos personales sensibles para su adecuada protección durante el análisis de los casos.

Se informó a los pacientes candidatos a entrar en el proyecto a través de una Hoja de Información al Paciente. Además, todos los pacientes participantes en el estudio prestaron previamente su consentimiento escrito, informado y voluntario para el uso de sus muestras.

El proyecto fue aprobado por el comité de ética PEIBA con código del proyecto 0026-N-16.

3. 3. Estudio SNPs seleccionados:

- Extracción de DNA:

La extracción de DNA a partir de las células de la mucosa bucal recolectadas en hisopos se realizó mediante un protocolo desarrollado por el centro de genómica e investigación oncológica GENYO (Cheek saliva extraction protocol). Consiste en una lisis celular de las muestras con un buffer de extracción a base de proteinasa K, seguido de una precipitación de proteínas con isopropanol, un aislamiento y purificación con

acetato de amonio y etanol absoluto; y finalmente se eluye el DNA extraído en agua destilada.

La cuantificación del DNA se realizó con el espectrofotómetro de UV visible de espectro completo Nanodrop™ 2000c (Thermo Scientific) que permite cuantificar y evaluar la pureza del DNA. La concentración se estableció mediante una medición de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nanómetros (nm); y la pureza se determinó mediante la relación de absorbancias 260nm/280nm, buscando ratios cercanos a 1.8 que refleja un estado libre de contaminación con proteínas o alcoholes.

- Genotipado con sondas TaqMan:

Los análisis de genotipado son experimentos que permiten diferenciar SNPs en muestras desconocidas y determinar su genotipo. Este tipo de análisis requiere dos pasos: una amplificación por PCR, seguida de una lectura del punto final de las señales fluorescentes emitidas en la reacción. Los SNPs del estudio (rs1801280, rs1050450, rs17650792, rs7310505, rs3740562, rs662, rs10432782, rs4880, rs1001179, rs743572 y rs746432) se genotiparon mediante el sistema StepOne™ de Applied Biosystems que utiliza sondas TaqMan® (MGB) en el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR de Applied Biosystems. Cada sonda TaqMan® (MGB) contiene: un fluorocromo notificador en el extremo 5' (Fluorocromo VIC® para el alelo 1 y Fluorocromo FAM® para el alelo 2); un apantallador no fluorescente (NFQ) en el extremo 3' y un ligando de unión al surco menor (MGB) [87]. Se desarrollan más detalles de las pruebas de cada SNP en la Tabla 2.

Tabla 2: Detalles de las sondas usadas.

Gen	SNP ID	Prueba ID
<i>GSTM1</i>	CNV	Hs02575461_cn
<i>NAT2</i>	rs1801280	C__1204093_20
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	C__25986767_70
<i>TXNRD1</i>	rs7310505	C__29227804_10
<i>PRDX3</i>	rs3740562	C__1340175_20
<i>CYP17A1</i>	rs743572	C__2852784_30
<i>PONI</i>	rs662	C__2548962_20
<i>ESRI</i>	rs746432	C__835086_20
<i>GPXI</i>	rs1050450	-
	rs17650792	C__7911963_10
<i>CAT</i>	rs1001179	C__11468118_10
<i>SOD1</i>	rs10432782	C__30038646_10
<i>SOD2</i>	rs4880	C__8709053_10

Durante la reacción de amplificación por PCR, las sondas tienen en un extremo el fluorocromo notificador (VIC® o FAM®) y en el otro extremo el bloqueador NFQ, de manera que la señal fluorescente es suprimida. Durante la fase de extensión, la sonda se une por complementariedad a su sitio diana en el DNA la polimerasa AmpliTaq Gold® rompe la sonda y libera al fluorocromo notificador, que al separarse del bloqueador NFQ puede ahora emitir fluorescencia. Este proceso se repite en cada ciclo sin interferir con la

síntesis exponencial de los productos de la amplificación. El sistema de PCR a tiempo real detecta la fluorescencia emitida y en función de la cantidad y el tipo de fluorocromo excitado determina el o los alelos presentes en la muestra para ese punto determinado (Figura 6) [88].

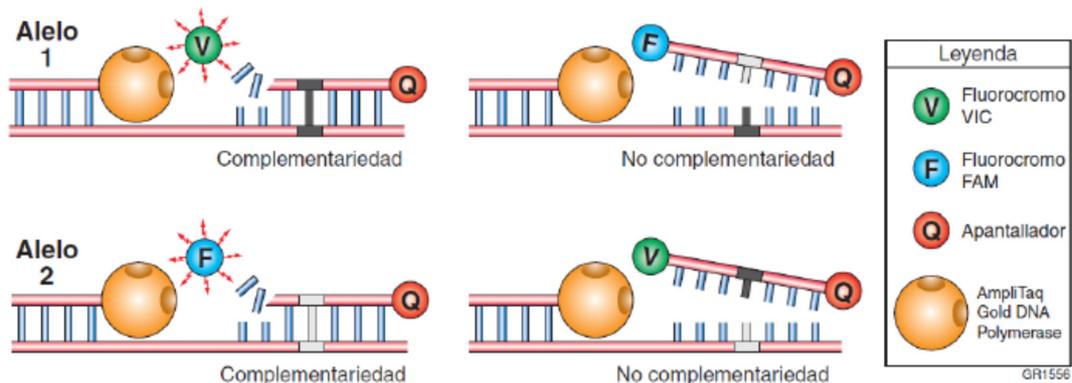


Figura 6: resultados de complementariedad y no complementariedad entre secuencias de alelos y sondas en los experimentos de genotipado. (*Guía de reactivos de Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System; 2010*).

El análisis de las muestras incluyó en todos los casos controles negativos (NTC) en cada placa, que contenían todos los componentes de la reacción, excepto DNA; así como controles positivos de genotipo conocido. Las condiciones de la amplificación fueron: 50°C por 2 minutos (1 ciclo); 95°C por 10 minutos (40 ciclos); 95°C por 15 segundos (1 ciclo); 60°C por 1 minuto (1 ciclo) y mantenimiento de 4°C. En cuanto a los resultados del genotipado, las posibilidades eran: un aumento de la fluorescencia del fluorocromo VIC® que indica homocigosidad del alelo 1; un aumento de la fluorescencia del fluorocromo FAM® que indica homocigosidad del alelo 2; y un aumento de ambas señales fluorescentes que indica heterocigosidad.

Finalizada la amplificación se realizó el análisis de los resultados mediante una lectura de punto final de las señales de fluorescencia emitidas durante el proceso con el Allelic Discrimination (AD) Plate Document. Este archivo permite determinar la combinación de alelos presente en cada muestra, en función de la fluorescencia detectada en cada uno de los pozos. La confirmación de los resultados se realizó mediante una revisión del archivo Standard Curve (AQ) Plate Document, que permite visualizar las curvas de amplificación de cada muestra a tiempo real (Figura 7).

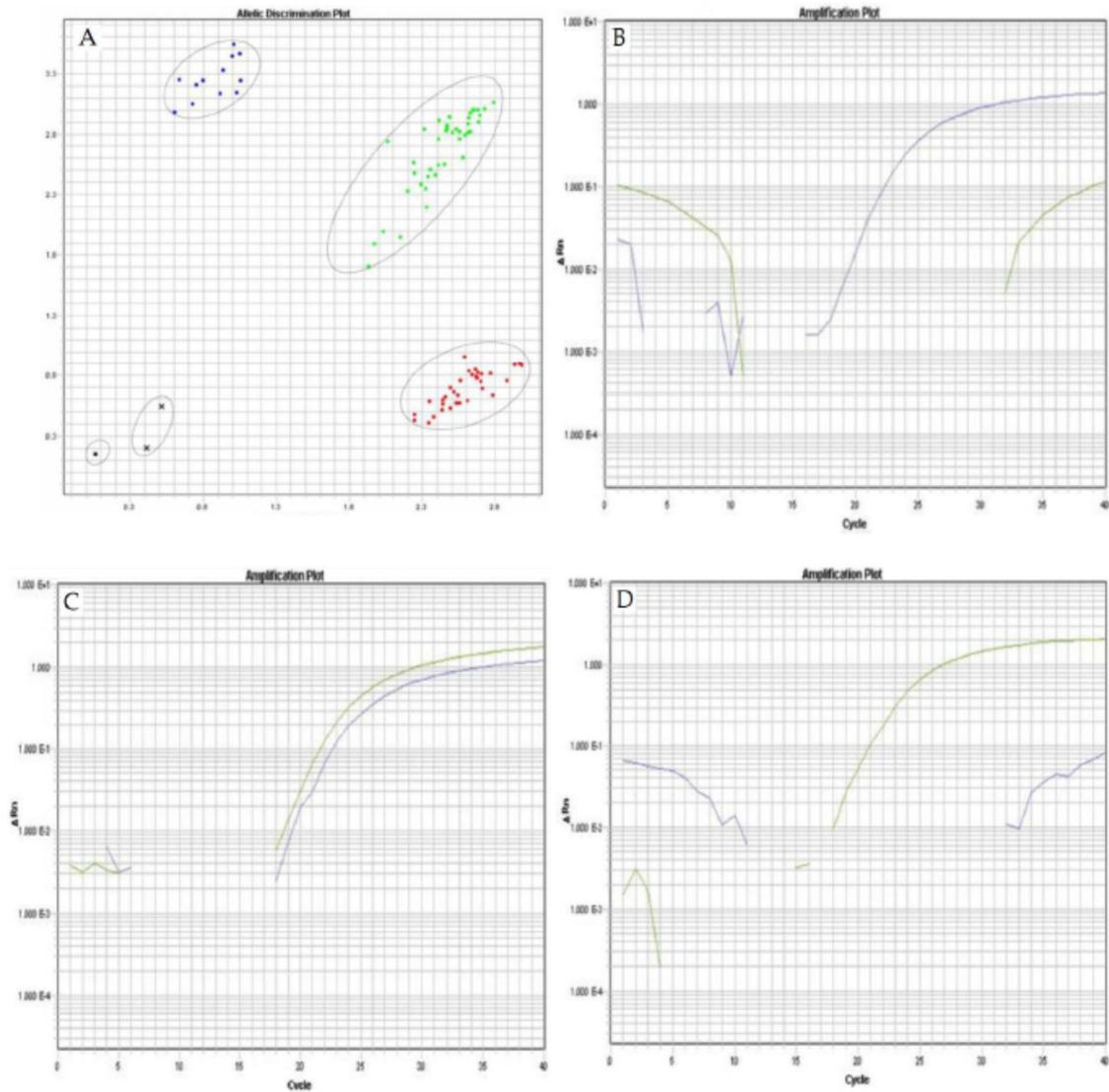


Figura 7: Gráficos de genotipado de alelos presentes en las muestras. (A). Gráfico Allelic Discrimination Plate Document que muestra en azul arriba a la izquierda el grupo de muestras homocigotos para el alelo 1; en verde al centro derecha el grupo de muestras heterocigoto 1 y 2; en rojo abajo derecha el grupo de muestras homocigoto para el alelo 2; y en negro abajo izquierda el grupo de controles NTC o muestras indeterminadas. A continuación, los gráficos Standard Curve Plate Document: (B) Muestra homocigoto para el alelo 1; (C) Muestra heterocigoto 1 y 2; y (D) Muestra homocigoto para el alelo 2 (Fisher Scientific T. Single-Tube Assays for Use with: TaqMan® Predesigned SNP Genotyping Assays TaqMan®; 2017).

3. 4. **Análisis de aislamiento y expresión de miRNAs:**

- Extracción de RNA:

El primer paso para analizar el perfil de expresión de miRNAs de los pacientes es la extracción de RNA a partir de células encontradas en las muestras de orina de 42 pacientes. Para la extracción de RNA se usó Trizol® /cloroformo. Para conocer en detalle el método de extracción de RNA, véase el ANEXO III. El RNA extraído a partir de las distintas muestras, fue cuantificado con el NanoDrop™ 2000c para medir su concentración y pureza. En este caso una relación A260/A280 en torno a 2.0 es aceptado para el RNA puro.

- Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR):

Es la técnica más sensible para la identificación y cuantificación de los niveles de miRNAs que contiene una muestra. En primer lugar, el RNA es transcrito a DNA complementario (DNAc) por la enzima retrotranscriptasa. Entonces la cadena de DNAc monocatenario es usada como molde para la reacción de qPCR. El análisis de la expresión de miRNAs se llevó a cabo mediante sondas TaqMan™ (Applied Biosystem, Foster City, CA). Y durante todo el proceso de trabajo tanto los reactivos como los productos deben permanecer siempre en hielo para evitar su degradación.

○ Retrotranscripción:

Para llevar a cabo la retrotranscripción de los miRNAs se utilizaron dos kits diferentes: el kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription para RNA pequeño

nucleolar RNU6B y el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis para los miRNAs miR141, miR-375 y miR-130b (ambos de Applied Biosystem, Foster City, CA).

El kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription está diseñado para trabajar con primers específicos para cada miRNA que son proporcionados junto con las sondas TaqMan™.

Por su parte, el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis está diseñado para trabajar con primers universales lo que permite partiendo de una sola muestra de RNA, obtener una molécula de DNAc con múltiples dianas de miRNA. Para ello a partir de la muestra de RNA total modifica el miRNA maduro por la adición de colas de poliadelinación (poli-A) al extremo 3' y la ligación de un adaptador en el extremo 5' para su elongación. Las secuencias presentes en ambos extremos ampliados de los miRNA maduros son reconocidas por los primers universales del kit para su conversión en DNAc.

Por último, para la obtención de DNAc del gen GAPDH se utilizó el kit QuantiTect® Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Alemania).

Todas las reacciones se realizaron en el Veriti™ Thermal Cycler empleando los reactivos y condiciones recomendados en cada caso por el kit correspondiente. Una vez concluidas todas las reacciones de retrotranscripción, el DNAc de cada una de las muestras fue almacenado a -20°C hasta su uso.

- Amplificación por qPCR:

Es el segundo paso de RT-qPCR, en el que la DNA polimerasa utiliza el DNAc como molde para amplificar las secuencias diana de los miRNAs, usando primers y sondas TaqMan™ específicos.

Para llevar a cabo la reacción son necesarios los siguientes reactivos:

- DNAc previamente diluido.
- 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix. Contiene AmpliTaq Gold® DNA Polimerasa, dNTPs con dUTP, ROX™ Passive Reference (para normalizar diferencias entre pocillos debidas a artefactos), AmpErase® UNG (enzima que elimina productos de amplificación previos en los que se haya incorporado el uracilo) y Buffers.
- 20X TaqMan® miRNA Assay o 20X TaqMan® Advanced miRNA Assay (específico para cada miRNA). Contienen dos primers (forward y reverse) con la secuencia para la región de interés a amplificar y la sonda TaqMan® marcada cada con el fluorocromo.

Para los ensayos de expresión de GAPDH se emplearon primers prediseñados KiCqStart® SYBR® Green (Sigma-Aldrich, San Luis, MO).

Para llevar a cabo la reacción son necesarios los siguientes reactivos:

- DNAc previamente diluido.

- iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix. Contiene iTaq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂, SYBR® Green I dye, potenciadores, estabilizadores y una mezcla de colorantes pasivos de referencia (incluidos ROX).
- Primers forward y reverse. - H₂O libre de DNAsas.

En todos los análisis se realizaron tres réplicas por condición para determinar las variaciones y optimizar su precisión. Además, se incluyó un control negativo (NTC) que incluye la master mix y la sonda pero carece de DNAc, para corroborar que la amplificación de las muestras no se debía a la contaminación de alguno de los componentes.

La reacción de amplificación se realizó en el sistema de 7900HT Fast Real-Time PCR que recoge las curvas de amplificación a tiempo real. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: 50°C durante 2 minutos (1 ciclo); 95°C durante 10 minutos (40 ciclos); 95°C durante 15 segundos (1 ciclo); 60°C durante 1 minuto (1 ciclo) y mantenimiento a 4°C.

En un ensayo de PCR a tiempo real se detecta una reacción positiva de amplificación mediante la acumulación de una señal fluorescente. El ciclo umbral (Ct) se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente alcance un umbral definido. Los valores de Ct son inversamente proporcionales a la abundancia de miRNA/RNAm diana y se utilizan para estimar el nivel de expresión.

3. 5. Análisis de contaminantes orgánicos en orina:

Se determinaron la concentración de BaP, NPh, BPA y EPB de las muestras de orina. El procedimiento de extracción líquido-líquido usado se base en el propuesto por Vela-Soria et al. (2014), con algunas modificaciones. Estos cambios consisten en el uso de 4ml de orina en lugar de 5ml, la adaptación proporcional de volúmenes de extracción solventes (600 μl de cloroformo y 400 μl de acetona) y la realización de 4 ciclos de extracción. Como estándar interno, se añadieron a cada muestra 100 μl de α -naftol 10 mg l^{-1} en etanol, con el fin de obtener una concentración de 250 $\mu\text{g l}^{-1}$.

El extracto obtenido se evaporó en SpeedVac durante 15 minutos a temperatura ambiente, evitando que los tubos se secaran por completo (residuo de 150–200 μl). Se añadió Na_2SO_4 anhidro para eliminar la humedad. Entonces, se recogieron cuidadosamente 100 μl del extracto en un tubo de Eppendorf de 1,5 ml, procurando que no se cogieran trazas de sal. Se añadieron 100 μl de una mezcla de 50 % BSTFA, 25 % piridina y 25 % AcOEt, y los tubos se agitaron para garantizar la homogeneidad de la disolución y se transfirieron al vial.

- Determinación del contenido total de los compuestos químicos seleccionados en orina:

Se tomaron 4ml de la alícuota urinaria (cada muestra por triplicado) y se añadieron 100 μl de la dilución interna estándar (α -naphthol). 100 μl de β -glucuronidasa de *Helix pomatia* (sólido) preparados en buffer (solución acuosa de ácido acético (1 mol l^{-1}) y acetato amónico (1 mol l^{-1}) en un ratio de 1:1.73 (v/v)) y se añadieron 25 μl de β -

glucuronidasa/Arilsulfatasa (líquida); la mezcla se incubó 24 horas. Entonces se realizó el mismo procedimiento de extracción descrito anteriormente.

- Análisis GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry):

Para el análisis instrumental se usó un sistema Agilent 6890 series GC conectado a un 5973 MS (GC–MS). Se empleó el modo *Selected Ion Monitoring* (SIM). La columna de cromatografía fue una columna capilar HP-5MS (30 m × 0,25 mm i.d.; 0.25 µm). Como gas transportador se empleó Helio Helium (1 ml min⁻¹) en modo no dividido. Se inyectó un volumen de 1 µl. El bloque inyector operó a 270°C. El programa del horno estaba ajustado de la siguiente manera: temperatura inicial de 60 °C (2 min), luego se incrementó a 120 °C subiendo 30 °C/min (2 min); hasta 200 °C a 5 °C/min (3 min) y a 240 °C a 10 °C/min (5 min); finalmente ascendió hasta 270 °C a 10 °C/min (7,5 min) y por último a 295 °C a 50 °C/min (11 min). El tiempo total del análisis fue de 56 minutos.

3. 6. Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico y la presentación de los resultados se emplearon el paquete estadístico SPSS v.22 (IBM Inc, Armonk, NY) y el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). En primer lugar, se hizo un análisis descriptivo de las variables clínicas y de las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs en la población (media+desv. y/o frecuencias y porcentajes). Las variables continuas fueron categorizadas y los análisis de asociación con los SNPs se realizaron siguiendo distintos modelos de herencia genética: codominante, dominante y recesivo.

Las pruebas de chi-cuadrado y Fisher fueron usadas para analizar variables cualitativas, para muestras de pequeño tamaño. Para valorar cuáles de los factores genéticos y/o ambientales pueden ser determinantes para el riesgo de CaV se realizaron análisis empleando regresión logística binaria ajustada y no ajustada. La asociación entre los SNPs y los parámetros clínicos de agresividad de CaV también se analizó usando regresión logística binaria. Los valores estimados de asociación fueron estimados mediante el odds ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% y el nivel de significación establecido fue de un p valor < 0.05.

Los niveles de expresión de cada miRNA fueron originalmente presentados como valores Ct. Los valores de Ct no determinados en el Ct =35 se consideraron indeterminados. Para el análisis de los datos, los valores Ct de cada muestra fueron normalizados (Δ Ct) restando el valor de Ct de un control endógeno a cada miRNA de estudio, es decir, Δ Ct = Ct miRNA de interés – Ct control endógeno.

La expresión relativa de los miRNAs fue estimada como el valor relativo de $2^{-\Delta\Delta CT}$. El test de Kolmogorov-Smirnov se usó para analizar la distribución normal de los datos. Para determinar las diferencias significativas entre los niveles de expresión de los miRNAs de interés y las variables clínicas relacionadas con la agresividad del CaV (categorizadas como variables ordinales, siendo 0 = mínima expresión, 1 = baja expresión, 2 = moderada expresión y 3 = máxima expresión, de acuerdo a los cuartiles de los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$) se aplicó el test no paramétrico U de Mann Whitney.

Las diferencias en los niveles de contaminantes estudiados según los genotipos de las variantes genéticas seleccionadas fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El coeficiente de correlación de Spearman se empleó para evaluar las relaciones entre los niveles de miRNA.

4. RESULTADOS:

4. 1. Características generales de la población de estudio:

En la Tabla 3 mostramos las principales características de la población de estudio, estratificada entre sujetos con CaV y controles sanos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y la exposición ambiental a polvo y humo. Respecto a los estilos de vida, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de exfumadores, en el consumo semanal de vino, cerveza y destilados, y en las rutinas de ejercicio físico.

Tabla 3: Características de la población de estudio.

	CaV n (%)	Control, n (%)	OR (95%IC)	p-valor*
Edad	65.5 ± 11.1** n =99	54.4 ± 11.2** n = 125	1.09 (1.06-1.13)	< 0.001
Sexo (n=225)				0.646
Varones	78 (77.2)	49 (74.6)	Ref	
Mujeres	23 (22.8)	32 (25.4)	0.84 (0.45-1.56)	
Tabaquismo (n=149)				0.899
Nunca fumadores	54 (66.7)	46 (67.6)	Ref	
Fumadores activos	27 (33.3)	22 (32.4)	1.05 (0.53-2.08)	
Consumo alcohol (n=206)				0.409
Nunca bebedores	25 (30.9)	32 (25.6)	Ref	
Bebedores activos	56 (69.1)	93 (74.4)	0.77 (0.42-1.43)	
Exfumadores (n=126)				0.019
No	33 (41.8)	10 (21.3)	Ref	
Si	46 (58.2)	37 (78.7)	0.38 (0.16-0.86)	
Exposición ambiental a polvo (n=204)				<0.001
No	50 (62.5)	106 (85.5)	Ref	
Si	30 (37.5)	18 (14.5)	3.53 (1.80-6.93)	

Exposición ambiental a humo (n=204)				0.006
No	62 (77.5)	113 (91.1)	Ref	
Si	18 (22.5)	11 (8.9)	2.98 (1.33-6.71)	
Exposición a químicos (n=203)				0.177
No	50 (62.5)	88 (71.5)	Ref	
Si	30 (37.5)	35 (28.5)	1.51 (0.83-2.75)	
Exposición a radiación ionizante (n=203)				0.440
No	73 (91.2)	108 (87.8)	Ref	
Si	7 (8.8)	15 (12.2)	0.69 (0.27-1.74)	
Consumo de cerveza (n=159)				<0.001
<3 cervezas/semana	46 (57.9)	22 (26.8)	Ref	
3-9 cervezas/semana	19 (24.7)	48 (58.5)	0.19 (0.09-0.40)	
>9 cervezas/semana	12 (15.6)	12 (14.6)	0.48 (0.19-1.23)	
Consumo de vino (n=128)				<0.001
No	39 (51.3)	8 (15.4)	Ref	
<3 vasos 150ml/semana	15 (19.7)	30 (57.7)	0.10 (0.04-0.27)	
≥ 3 vasos 150ml/semana	22 (28.9)	14 (26.9)	0.32 (0.12-0.89)	
Consumo de destilados (n=116)				0.001
No	46 (60.5)	8 (26.7)	Ref	
<3 copas/semana	17 (22.4)	18 (60.0)	0.11 (0.04-0.29)	
≥ 3 copas/semana	13 (17.1)	4 (13.3)	0.45 (0.13-1.62)	
Actividad física (días/semana) (n=107)				0.003
<2	4 (12.9)	14 (18.4)	Ref	
2-4	5 (16.1)	35 (46.1)	0.50 (0.12-2.14)	
>5	22 (71.0)	27 (35.5)	2.85 (0.82-9.91)	
Actividad física (45 min seguidos) (n=105)				0.027
No	51 (63.0)	9 (37.5)	Ref	
Si	30 (37.0)	15 (62.5)	0.35 (0.14-0.91)	

*Chi cuadrado (excepto t de Student para la edad).

**Media ± desviación estándar.

4. 2. Estadificación clínica de los pacientes con CaV:

Se realizó un análisis descriptivo de la estadificación clínica de los pacientes con CaV de la población de estudio, tal y como se recoge en la Tabla 4. Cabe destacar que la mayoría de los pacientes (72.7%) presentaron tumores únicos; además un 75.8% fueron tumores no músculo-invasivos, y solo un 10.1% de los pacientes fueron metastásicos.

Tabla 4: Análisis descriptivo del estadiaje de los pacientes con CaV de nuestra población de estudio.

	Frecuencia	Porcentaje
Número de tumores		
1	72	72.7
2	9	9.1
3	5	5.1
>3	13	13.1
T		
Ta	31	31.3
T1	44	44.4
T2	22	22.2
Tx	2	2.0
Grado		
Bajo	33	33.3
Alto	66	66.6
Riesgo		
Bajo	28	28.3
Medio	8	8.1
Alto	35	35.4
Muy alto	5	5.1
Músculo-invasivo	23	23.2
Superficial		
Si	75	75.8
No	24	24.2
Ta bajo grado		
Si	25	25.5
No	73	74.5
Metástasis		
No	89	89.9
Si	10	10.1

4. 3. Asociación de SNPs y miRNAs con CaV:

De los 11 SNPs analizados en este estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con CaV y los sujetos control para los polimorfismos *CYP17A1*, *CAT* y *SOD1* (Tabla 5). Así, para el polimorfismo *CYP17A1*, las variante AA fue más frecuentes en el grupo de pacientes con CaV al igual que la variante GG del *SOD1*; por el contrario, la variante TT del polimorfismo *CAT* y la variante GT del *SOD1* fueron más frecuentes en sujetos del grupo control.

Tabla 5: Distribución de genotipos para personas con CaV y controles sanos.

	CaV n (%)	Controles n (%)	<i>p</i> -valor*
<i>NAT2</i>			0.454
CC	21 (48.8)	22 (51.2)	
CT	53 (48.2)	57 (51.8)	
TT	25 (39.1)	39 (60.9)	
<i>GPX1</i>			0.232
AA	15 (53.6)	13 (46.4)	
AG	23 (37.1)	39 (62.9)	
GG	61 (48.4)	65 (51.6)	
<i>SOD2</i>			0.098
AA	31 (51.7)	29 (48.3)	
AG	43 (38.4)	69 (61.6)	
GG	24 (54.5)	20 (45.5)	
<i>PONI</i>			0.363
CC	8 (38.1)	13 (61.9)	
CT	42 (54.5)	35 (45.5)	
TT	49 (47.6)	54 (52.4)	
<i>CYP17A1</i>			<0.001
AA	78 (57.4)	58 (42.6)	
AG	21 (32.8)	43 (67.2)	
GG	0 (0)	6 (100)	
<i>ESR1</i>			0.599
CC	0 (0)	1 (100)	
CG	8 (42.1)	11 (57.9)	
GG	91 (46.9)	103 (53.1)	

CAT			0.044
CC	64 (46.7)	73 (53.3)	
CT	34 (52.3)	31 (47.7)	
TT	1 (10)	9 (90)	
PRDX3			0.272
AA	7 (30.4)	16 (69.6)	
AG	46 (47.9)	50 (52.1)	
GG	46 (48.4)	49 (51.6)	
TXNRD1			0.986
AA	6 (50)	6 (50)	
AC	37 (47.4)	41 (52.6)	
CC	56 (47.9)	61 (52.1)	
SOD1			<0.001
GG	13 (81.3)	3 (18.8)	
GT	4 (17.4)	19 (82.6)	
TT	82 (48)	89 (52)	
GPX1 (rs17650792)			0.242
AA	32 (47.1)	36 (52.9)	
AG	37 (43)	49 (57)	
GG	30 (57.7)	22 (42.3)	

*Test Chi-cuadrado (χ^2). Todos los análisis se realizaron con un modelo codominante. Se realizaron análisis de equilibrio de Hardy–Weinberg y Linkage Disequilibrium (LD).

Cuando se realizaron los análisis comparando los modelos recesivos y dominantes, todas estas variantes mejoraron su significación estadística y los polimorfismos *PRDX3* y *GPX1* (rs17650792) casi mostraron diferencias significativas (Tabla 6).

Tabla 6: Distribución de genotipos en pacientes con CaV y controles.

	CaV n (%)	Controles n (%)	<i>p</i> -valor
<i>CYP17A1</i>			0.023
GG (Recesivo)	0 (0.0%)	5 (100%)	
AA+AG	99 (53.8%)	85 (46.2%)	
AA (Dominante)	78 (60.5%)	51 (39.5%)	0.001
AG+GG	21 (35.0%)	39 (65.0%)	
<i>CAT</i> (Recesivo)			0.009
TT	1 (10.0%)	9 (90.0%)	
CT+CC	98 (53.0%)	87 (47.0%)	
<i>PRDX3</i> (Dominante)			
AA	7 (31.8%)	15 (68.2%)	0.067
AG+GG	92 (52.6%)	83 (47.4%)	
<i>SOD1</i> (Recesivo)			0.004
GG	13 (31.8%)	2 (13.3%)	
GT+TT	86 (52.6%)	92 (51.7%)	
<i>GPXI</i> (rs17650792) (Dominante)			
GG	30 (63.8%)	17 (36.2%)	0.070
AG+AA	69 (48.6%)	73 (51.4%)	

La Tabla 7 muestra los resultados del análisis de regresión logística binaria de riesgo de CaV ajustado a las variantes genéticas estudiadas. Cuando cada SNP se incluyó en el análisis como variable única e independiente, solamente *CYP17A1* (rs743572) y *SOD1* (rs10432782) tuvieron asociación significativa, con los alelos G y T mostrando una reducción del riesgo de padecer CaV respecto a los portadores de genotipos AA y TT respectivamente. Cuando el análisis de regresión se ajustó a todos los genotipos estudiados como variables independientes, la asociación significativa de *CYP17A1* y *SOD1* se mantuvo, y los portadores del alelo A del *GPXI* (rs17650792) mostraron una asociación cercana a la significación (un riesgo reducido de CaV) respecto al genotipo GG.

Tabla 7: Análisis mediante regresión logística (RL) del riesgo de CaV ajustado por los polimorfismos genéticos.

Genotipo	Modelos de RL no ajustados			Modelos de RL ajustados*		
	OR	95% CI	<i>p</i> -valor	OR	95% CI	<i>p</i> -valor
<i>NAT2</i> (n=217)			0.456			
CT	0.97	0.48 – 1.97	0.942			
TT	0.67	0.31 – 1.47	0.318			
T vs. CC	0.85	0.44 – 1.66	0.637			
C vs. TT	1.46	0.81 – 2.65	0.211	1.71	0.86 – 3.38	0.123
<i>GPXI</i> (n=216)			0.235			
AG	0.51	0.21 – 1.26	0.146			
GG	0.81	0.36 – 1.85	0.662			
G vs. AA	0.70	0.32 – 1.55	0.380	0.47	0.18 – 1.21	0.116
A vs. GG	0.78	0.45 – 1.34	0.368			
<i>SOD2</i> (n=216)			0.099			
AG	0.58	0.31 – 1.10	0.095			
GG	1.12	0.52 – 2.45	0.771			
A vs. GG	0.63	0.32 – 1.23	0.173			
G vs. AA	0.67	0.37 – 1.23	0.195	0.62	0.30 – 1.24	0.176
<i>PONI</i> (n=201)			0.367			
CT	1.95	0.73 – 5.24	0.185			
TT	1.48	0.56 – 3.85	0.429			
T vs. CC	1.51	0.59 – 3.89	0.386			
C vs. TT	1.15	0.66 – 2.00	0.625	0.99	0.53 – 1.84	0.965
<i>CYP17A1</i> (n=206)			0.006			
AG	0.36	0.20 – 0.68	0.001			
GG	-	-	-			
A vs. GG	-	-	-			
G vs. AA	0.32	0.17– 0.57	<0.001	0.26	0.13 – 0.52	<0.001
<i>ESRI</i> (n=214)			-			
C vs. GG	0.76	0.30 – 1.93	0.556	0.41	0.14 – 1.19	0.102
G vs. CC	-	-	-			

<i>CAT</i> (n=212)			0.101			
CT	1.25	0.69 – 2.26	0.458			
TT	0.13	0.02 – 1.03	0.053			
T vs. CC	1.00	0.57 – 1.76	0.995	0.82	0.42 – 1.59	0.560
C vs. TT	8.48	1.06 – 68.18	0.044			
<i>PDX3</i> (n=214)			0.285			
AG	2.10	0.79 – 5.57	0.135			
GG	2.15	0.81 – 5.69	0.125			
G vs AA	2.12	0.84 – 5.40	0.113	1.75	0.61 – 5.04	0.229
A vs. GG	0.86	0.50 – 1.47	0.571			
<i>TXNRD1</i> (n=207)			0.986			
AC	0.90	0.27 – 3.04	0.993			
CC	0.92	0.28 – 3.01	0.796			
C vs. AA	0.91	0.28 – 2.93	0.877			
A vs. CC	1.00	0.56 – 1.73	0.900	0.93	0.48 – 1.78	0.816
<i>SOD1</i> (n=210)			0.001			
GT	0.05	0.01 – 0.25	<0.001			
TT	0.21	0.06 – 0.77	0.019			
T vs GG	0.18	0.05 – 0.67	0.010	0.12	0.03 – 0.47	0.003
G vs. TT	0.84	0.42 – 1.69	0.623			
<i>GPXI</i> (n=206)			0.246			
AG	0.85	0.45 – 1.61	0.617			
GG	1.53	0.74 – 3.18	0.249			
A vs. GG	0.60	0.32 – 1.12	0.110	0.48	0.23 – 1.02	0.056
G vs. AA	1.06	0.59 – 1.90	0.840			

*Los genotipos usados como predictores en los modelos de la regresión logística corresponden a aquellos indicados en la misma fila en la primera columna de la izquierda.

La Tabla S3 muestra la asociación de los polimorfismos genéticos estudiados con parámetros asociados a la agresividad del CaV (número de tumores, grado, estadio

Ta bajo grado, tumor superficial o no, presencia de metástasis). Se describió que los portadores de genotipo *NAT* CC tenían menor probabilidad de tener CaV múltiple. Los portadores del genotipo *SOD2* AA tienen un mayor riesgo de tener tumores de alto grado, mientras que los portadores del genotipo *ESR1* GG tenían un menor riesgo de presentar ese grado tumoral. Los portadores de *SOD2* tienen menor probabilidad de tener un tumor Ta de bajo grado (los portadores de *PRDX3* casi alcanzaron la significación estadística para ese mismo resultado); por otra parte, los portadores de *ESR1* GG presentaron un mayor riesgo de padecer Ta de bajo grado, aunque no lograron llegar a la significación estadística. Finalmente, los portadores del genotipo *PONI* TT mostraron una tendencia hacia una menor probabilidad de presentar metástasis, aunque tampoco se alcanzó la significación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tumores superficiales y los músculo-infiltrantes.

Los resultados del análisis de regresión logística múltiple del riesgo de padecer CaV respecto a los factores de exposición ambiental y los SNPs que habían mostrado significación estadística en el análisis bivariante se muestran en la Tabla 8. El análisis mostró que la edad y la exposición a humo y/o polvo incrementaba el riesgo de CaV, mientras que el genotipo *CYP17A1* (AA vs. G) se asoció a menor riesgo de CaV. Los genotipos *GPXI* rs17650792 (GG vs. A) y *SOD1* (GG vs. T) se aproximaron a la significación estadística para un menor riesgo de CaV.

Tabla 8: Análisis de regresión logística múltiple del riesgo de CaV ajustado por factores de riesgo potenciales.

Variable	Modelo de regresión logística múltiple (n=165)		
	OR	95% CI	p-valor
Edad	1.15	1.08 – 1.18	<0.001
Sexo	0.59	0.24 – 1.43	0.240
Exposición a humo y/o polvo *	7.58	2.92 – 19.68	<0.001
<i>CYP17A1</i> (AA vs. G)	0.28	0.12 – 0.68	0.004
<i>SOD1</i> (GG vs. T)	0.26	0.05 – 1.33	0.107
<i>GPX</i> rs17650792 (GG vs. A)	0.37	0.14 – 1.00	0.051

Pie de tabla 8: Los genotipos incluidos en los modelos fueron aquellos que mostraban asociación significativa en el análisis de regresión logística múltiple realizado, incluyendo todos los genotipos como predictores.

Los resultados del análisis de miRNAs en la submuestra estudiada mostraban una fuerte asociación (coeficiente rho 0.7) de miR-193b con mirR-193a y miR-221-3p, y de miR-193a, miR-221-3p y miR-126 (Tabla S4). La comparación de los niveles en orina de los miRNAs estudiados en casos de CaV y en controles mostró una alta expresión de miR-126, miR193-b, miR-27a y miRNA 93-5p en pacientes con CaV respecto a los controles (Tabla S5 y Figura 8).

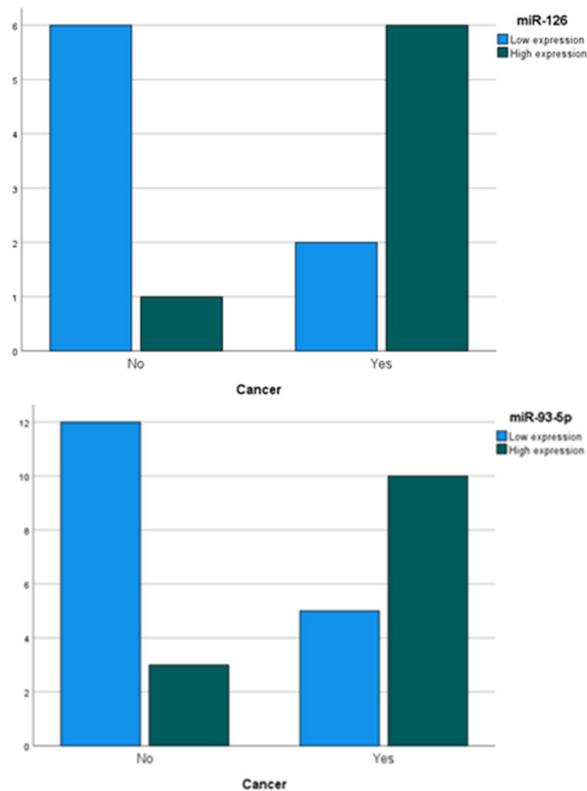


Figura 8: Comparación de miRNAs (alta vs. baja expresión) por CaV y controles. $p=0.010$ (miR-93-5p) y $p= 0.041$ (miR-126).

Cuando los niveles de expresión de miRNAs se compararon por los SNPs en la subpoblación de estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los patrones de expresión de miR-93-5p para portadores de polimorfismos genéticos *NAT2* (rs1801280) y *SOD2* (rs4880) (Figura 9). Se observó algo similar para miR-221-3p y *GPX1* (rs1050450), y miR-27a y *NAT2* (rs1801280) (Figura 10). Sin embargo, no se encontraron asociaciones significativas cuando los miRNAs (alta y baja expresión) se compararon respecto a los parámetros clínicos de agresividad de CaV.

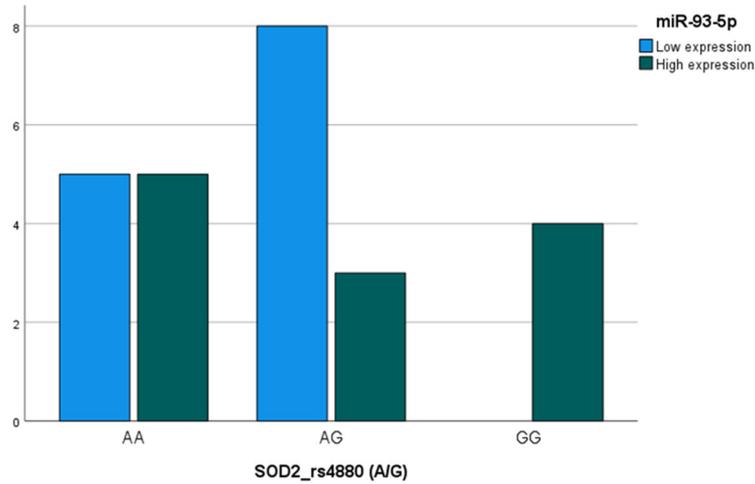


Figura 9: Asociaciones significativas encontradas al comparar las variantes genéticas respecto a miRNA 93-5p (alta vs. baja expresión). $p=0.044$.

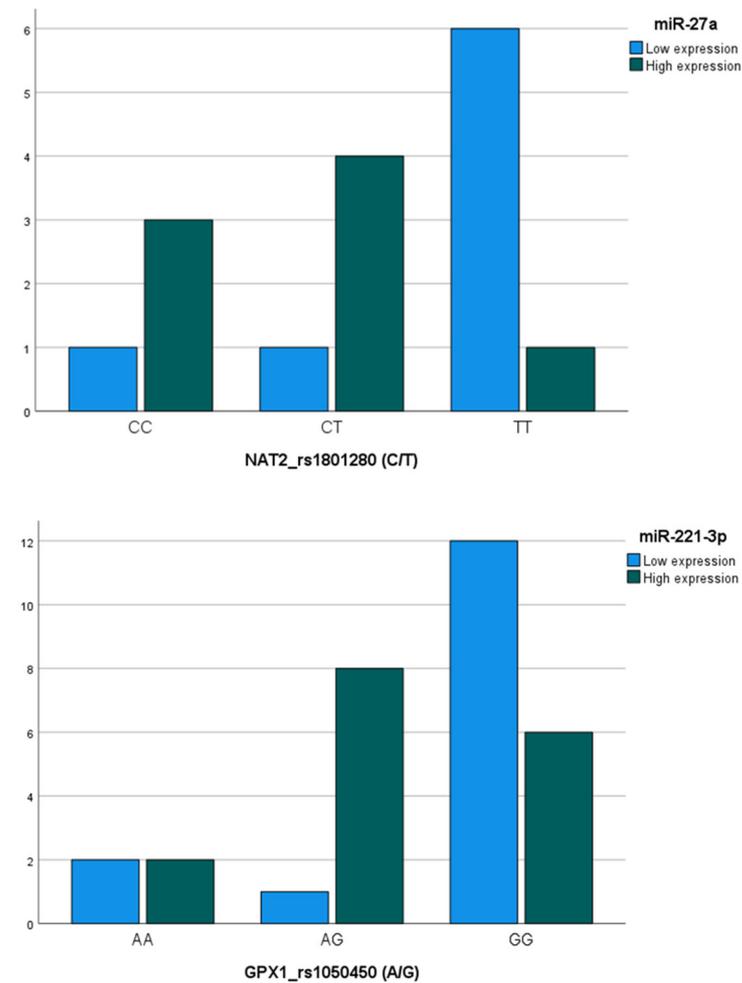


Figura 10: asociaciones significativas encontradas al comparar variantes genéticas según miRNA 27-a (alta vs. baja expresión). $p= 0.041$ (miR-27a y *NAT2*); $p=0.024$ (miR-221-3p y *GPX1*).

4. 4. Interacciones funcionales entre los genes estudiados:

La mayoría de los genes estudiados en este trabajo están involucrados en procesos biológicos como el metabolismo celular, la respuesta a agentes químicos o la respuesta celular a estímulos químicos. Se muestra un análisis de STRING en la Figura 11 donde se observan estos patrones de rutas moleculares. La función molecular común de los genes de nuestro estudio incluye actividad catalítica (todos excepto *ESR1*), actividad oxidorreductasa (*TXNRD1*, *PRDX3*), actividad antioxidante (todos excepto *ESR1* y *NAT2*) y actividad paraoxonasa-1 (*PON1*). Además, la mayor evidencia se encontró para la actividad superóxido dismutasa (*SOD1* y *2*) y oxidorreductasa (*TXNRD1* y *PRDX3*). La función molecular más importante basada en la probabilidad de evidencia y el número de genes compartidos es la actividad antioxidante (*SOD1*, *SOD2*, *TXNRD1*, *PRDX3*, *CAT*, *GPX1* y *PON1*).

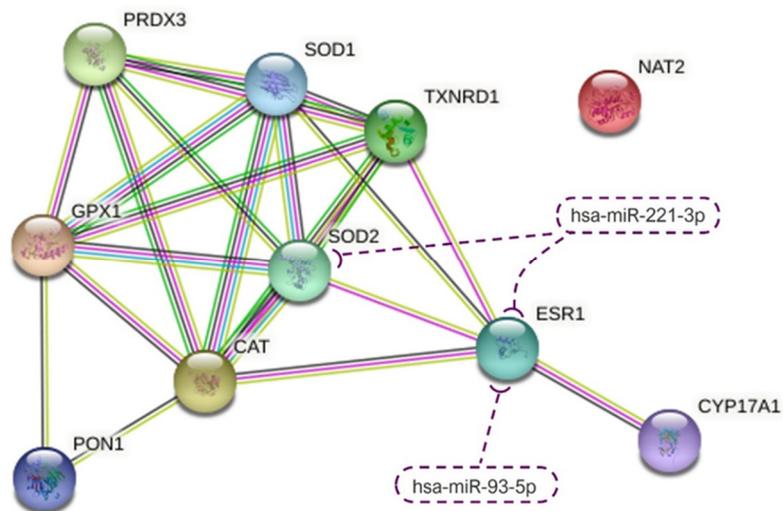


Figura 11: análisis STRING sobre las interacciones entre los genes analizados en el estudio.

Pie de Figura 11: la definición de las líneas de colores es la siguiente: rosa para genes co-mencionados en abstracts de PubMed, gris para genes co-expresados, amarillo para relaciones basadas en datos experimentales, verde para proximidad en el genoma y azul para la asociación entre genes en bases de datos estructuradas.

Por otro lado, el análisis realizado en *Mirtarbase* y *miRbase* arrojó tres genes como dianas potenciales de los miRNAs estudiados. Mientras que hsa-miR-93-5p se relacionó con *ESR1*, hsa-miR-221-3p se asoció con *SOD2* y *ESR1*, tal y como se aprecia en la Figura 11. Por el contrario, para hsa-miR-126, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-193b y hsa-miR-193a no hemos encontrado relaciones descritas previas con los genes elegidos en este estudio.

4. 5. Niveles urinarios de contaminantes orgánicos:

Se realizó el análisis de contaminantes ambientales en muestras de orina en el subgrupo de 17 pacientes con CaV y 25 controles: de dos PAH (BaP y NPh) y de dos disruptores endocrinos (BPA y EPB). Se encontraron niveles significativamente mayores de BaP y BPA en pacientes con CaV respecto a los controles (Tabla S6). Por otro lado, los varones presentaron niveles significativamente mayores de NPh que las mujeres.

Además, examinamos si los SNPs estudiados tenían impacto en los niveles urinarios de los contaminantes analizados. Como mostramos en la Tabla S7 del material suplementario, *PON1* y *CYP17A1* presentaron valores significativos de BPA ($p=0.002$) y BaP ($p = 0.044$) respectivamente.

4. 6. Asociaciones entre factores sociodemográficos, exposiciones químicas, estilos de vida y CaV:

La asociación entre factores sociodemográficos, estilos de vida, exposiciones ambientales y dieta con los parámetros clínico-patológicos del CaV que se muestran en

la tabla S8. La edad se asoció con un riesgo aumentado de padecer un CaV de alto grado y una menor probabilidad de que se tratara de un Ta de bajo grado. Los consumidores de alcohol tuvieron menos riesgo de metástasis, y algo similar se vio para los exfumadores, aunque no se alcanzó la significación estadística. Por otro lado, los pacientes expuestos a polvo tuvieron menor riesgo de tener un tumor superficial, mientras que la realización de ejercicio físico regular se asoció a una mayor probabilidad de padecer un Ta de bajo grado frente a otros estadios tumorales más agresivos. Finalmente, el consumo de dietas ricas en grasas se asoció a una menor probabilidad de tener un tumor superficial.

5. **DISCUSIÓN:**

Como ya hemos indicado, la cistoscopia es la principal prueba para la detección y seguimiento rutinario de pacientes con CaV, siendo ésta un procedimiento costoso, invasivo y doloroso. Por otro lado, la citología urinaria tiene una baja sensibilidad en tumores de bajo grado, mientras que los biomarcadores urinarios disponibles hasta la fecha (como NMP-22, UroVysion, etc) presentan muy baja especificidad. Esta situación hace necesario investigar en la identificación de nuevos biomarcadores más efectivos, para tener mejores herramientas diagnósticas, de seguimiento, pronósticas y de screening de población de riesgo [40, 89].

El biomarcador ideal tendría que ser coste-efectivo objetivo, de procesamiento rápido y de fácil interpretación, además de tener una alta sensibilidad y especificidad [90, 91]. Por otro lado, debería tener un alto valor predictivo negativo, ya que un test capaz de predecir la ausencia de tumor sería muy útil en la actividad clínica diaria [26].

En este sentido, se están realizando múltiples estudios para encontrar más biomarcadores, a parte de los urinarios ya descritos [92, 93, 94]. No obstante, el reducido número de pacientes en la mayoría de los estudios, la falta de validación externa en estudios prospectivos a gran escala y la no realización de estudios comparativos entre biomarcadores, hacen necesarios tanto el descubrimiento de mejores biomarcadores como una perfección en la metodología de los ya existentes. Además, los biomarcadores existentes, en general, son menos eficaces en CaV de bajo riesgo o tienen baja especificidad, y son más precisos en el diagnóstico inicial que en el seguimiento de la patología [95]. Así, consideradas en conjunto, estas limitaciones impiden la actual recomendación del uso de los biomarcadores urinarios por la mayoría de las sociedades científicas; la literatura actual sugiere que el uso aislado de estos biomarcadores es

insuficiente para solventar el problema. Por lo tanto, la tendencia actual en estas investigaciones se está centrando en la combinación de distintos biomarcadores, para desarrollar herramientas diagnósticas y de seguimiento del CaV más acertadas y para predecir su comportamiento para obtener información pronóstica [11].

Este estudio ha analizado la relación de CaV con SNPs que afectan a enzimas xenobióticas, defensas celulares antioxidantes y la biosíntesis y señalización de hormonas sexuales. Encontramos que los SNPs *CYP17A1* (rs743572), *CAT* (rs1001179) y *SOD1* (rs10432782) se asociaron significativamente con el riesgo de padecer CaV. Además, se analizó si los SNPs estudiados contribuían a la agresividad de este cáncer, encontrando que portadores de genotipo *NAT* CC tenían menor probabilidad de tener CaV múltiple. Los portadores del genotipo *SOD2* AA tenían un mayor riesgo de tener tumores de alto grado, mientras que los portadores del genotipo *ESR1* GG tenían un menor riesgo de presentar dicho grado tumoral. Los portadores de *SOD2* tenían menor probabilidad de tener un tumor Ta de bajo grado; por otra parte, los portadores de *ESR1* GG presentaron un mayor riesgo de padecer Ta de bajo grado, aunque no lograron llegar a la significación estadística. Finalmente, los portadores del genotipo *PON 1* TT mostraron una tendencia hacia una menor probabilidad de presentar metástasis, aunque tampoco se alcanzó la significación. Todos estos hallazgos sugieren el uso potencial de estas variantes genéticas como biomarcadores de la susceptibilidad a CaV.

Estudios previos han sugerido que *SOD*, *CAT* y *XOR* podrían ser considerados como marcadores pronósticos prometedores en cáncer de pulmón, ovario, colon y vejiga [60]. Además, estudios centrados en patrones de expresión de enzimas como *CAT*, *GPXI* y *SOD* han encontrado que la expresión y actividad génica de los enzimas antioxidantes se encuentran elevados en sangre en pacientes con CaV [96]. Sin embargo, existe controversia dado que hay estudios que sugieren que la actividad reducida de *CAT*, *GPX*

y *SOD* son característicos del CaV [56]. Por otra parte, se ha descrito que los receptores estrogénicos tanto *alfa* como *beta* contribuyen a la carcinogénesis urotelial y progresión tumoral [97]. Según nuestras investigaciones, estamos ante el primer estudio de casos- controles que analiza todos estos SNPs asociados previamente con CaV.

Tal y como hemos apuntado previamente, la heterogenicidad del CaV hace necesaria la caracterización oncomolecular de este cáncer con el objetivo de identificar nuevas herramientas más específicas. Aunque los miRNAs se han asociado con el CaV y su desarrollo, la relevancia de estos RNAs no codificantes en la patogenia de este tipo de cáncer aún no está clara [98, 99]. Nuestro estudio ha investigado el efecto de los miRNAs en el CaV, intentando además combinarlos con enzimas detoxificantes, antioxidantes y señalizadoras, con el objetivo de mejorar nuestro conocimiento sobre la efectividad patogénica de estos biomarcadores.

Nuestro trabajo ha mostrado una mayor expresión de miR-126, miR193-b, miR-27a y miR-93-5p en orina de pacientes con CaV respecto a controles. La expresión de miR-221-3p reveló una tendencia similar, aunque no se alcanzó la significación estadística (Tabla S5). Además, encontramos que hsa-miR-93-5p se relacionó con *ESRI* y hsa-miR-221-3p se asoció con *SOD2* y *ESRI*, lo que aporta información adicional sobre los potenciales mecanismos implicados en el CaV. miR-193b-3p es un miRNA supresor de tumores que reduce la expresión de proto-oncogenes como la ciclina D1 y ETS1; un estudio reciente demostró que dicho miRNA estaba inhibido en pacientes con CaV [60]. Por otro lado, miR-93-5p estaba significativamente aumentado en exosomas urinarios en pacientes con CaV respecto a controles sanos, y una sobreexpresión de este miRNA podría contribuir con la progresión tumoral suprimiendo la expresión de *BTG 2* [81]. Se ha descrito también una baja regulación de miR-126-3p en líneas celulares cancerosas de CaV [100], y su papel en la prevención de la progresión tumoral mediante la vía del

dominio 9 de la metalopeptidasa ADAM (*ADAM9*) [101]. Por otra parte, estudios previos han demostrado una correlación de la expresión de miR-149-5p y miR-193a-5p con una supervivencia global menor en pacientes con CaV [77]. En nuestro estudio una expresión alta de miR-193-a casi alcanzó la significación estadística en su asociación con el riesgo de CaV. Finalmente, el miR-221-3p se ha asociado con la carcinogénesis, mostrando varios estudios que se expresa de forma aberrante en tumores como el hepatocelular, gástrico y mama [102].

La mayoría de los análisis realizados hasta la fecha se han centrado en el papel de RNAs largos no codificantes (lncRNA), y recientemente un lncRNA se ha propuesto como un marcador pronóstico en el CaV no músculo-invasivo [103]. En esta tesis doctoral, los resultados preliminares sugieren que el miR-27a se asocia con el miR-193b y que *SOD2* (miR-93-5p y miR193b), *GPXI* (miR-221-3p) y *NAT2* (miR-27a) son biomarcadores que merecería la pena combinar en futuros estudios.

Aunque todos estos hallazgos abren nuevas vías de investigación, se necesita un mayor tamaño muestral para abordar el papel de los miRNA urinarios en el CaV.

En lo referente a la asociación de CaV , exposición ambiental a químicos y estilo de vida, los exfumadores presentaron un menor riesgo de padecer CaV. Aun siendo el tabaco el principal factor de riesgo conocido para este cáncer [2], no encontramos diferencias significativas en cuanto al consumo de tabaco. Sin embargo, los individuos expuestos a polvo o humo sí que tuvieron un riesgo aumentado de padecer CaV, lo cual refuerza las teorías que indican que las exposiciones a tóxicos ambientales juegan un papel determinante en el desarrollo de este tipo de tumores.

De acuerdo con las observaciones anteriores, una reciente revisión sistemática informó de la preocupación sobre la exposición urotelial crónica a carcinógenos vesicales,

los cuales estaban presentes en la orina de los consumidores de productos combustibles del tabaco [104]. Nosotros medimos los niveles urinarios de contaminantes orgánicos (PAH y disruptores endocrinos químicos) en una submuestra de nuestra población, encontrando niveles significativamente mayores de BaP y BPA en pacientes con CaV respecto a controles. Los PAH son unos químicos de una considerable significación ambiental, ya que la exposición a los mismos a largo plazo se ha asociado con tumores de distintas localizaciones, como el de piel, pulmón, colon o vejiga urinaria [105]. Por otro lado, mientras que los NPh han sido previamente descritos como biomarcadores urinarios de CaV [106], no hay informes realizados respecto a la relación con la exposición a BaP. El efecto de los PAH sobre la salud humana depende fundamentalmente de la vía y la duración de la exposición, del volumen o la concentración de PAH a los que uno está expuesto y la toxicidad relativa de los PAH [105].

Algunos PAH suponen un riesgo significativo para la salud humana por el potencial mutagénico y los efectos carcinógenos de sus metabolitos activos. En nuestro trabajo valoramos la potencial contribución de las variantes genéticas de enzimas xenobióticas metabolizantes y enzimas antioxidantes sobre el CaV, y, por primera vez en un mismo estudio, hemos combinado esta información con biomarcadores de exposiciones a químicos. Nuestros resultados preliminares sugieren que *PONI* (rs662) y *CYP17A1* (rs743572) pueden tener un papel relevante en casos de exposición a BPA y BaP respectivamente. Además, los niveles mayores de BPA en pacientes con CaV respecto a controles, y en pacientes con tumores múltiples respecto a los que presentan tumores únicos, pueden sugerir que el BPA juegue un papel tanto en el desarrollo del CaV como en su agresividad [107, 108]. No obstante, dado el pequeño número de individuos

estudiados para los contaminantes orgánicos (Tabla S6), se necesitan investigaciones más amplias.

Las enzimas xenobióticas se encuentran ampliamente en productos de consumo y materiales en contacto con alimentos, sugiriéndose que sean agentes que potencialmente puedan afectar a la fisiología vesical normal y al desarrollo del CaV. Por otra parte, aunque la vejiga no se puede catalogar como tejido hormonosensible, tanto receptores estrogénicos como androgénicos se expresan en este órgano [107, 108]. Así, aunque nuestros resultados deben ser interpretados con cautela, abren nuevas fronteras interesantes para investigaciones futuras sobre estos químicos y su biomonitorización.

6. CONCLUSIONES:

- Los SNPs *CYP17A1* (rs743572), *CAT* (rs1001179) y *SOD1* (rs10432782) se asocian significativamente con el riesgo de padecer CaV.
- Se sugiere el uso potencial como biomarcadores de susceptibilidad a CaV de las siguientes variantes genéticas:
 - Portadores de genotipo *NAT CC* tienen menor probabilidad de tener CaV múltiple.
 - Portadores del genotipo *SOD2 AA* tienen un mayor riesgo de tener tumores de alto grado, mientras que los portadores del genotipo *ESR1 GG* presentan un menor riesgo de padecer dicho grado tumoral.
 - Portadores de *SOD2 AA* tienen menor probabilidad de tener un tumor Ta de bajo grado.
 - Aunque no se alcanza la significación estadística, los portadores GG en el gen *ESR1* presentan un mayor riesgo de padecer Ta de bajo grado, y los portadores del genotipo TT en *PON-1* muestran una tendencia hacia una menor probabilidad de presentar metástasis.
- Existe una mayor expresión de miR-126, miR193-b, miR-27a y miRNA 93-5p en orina de pacientes con CaV respecto a controles.
- El miRNA 93-5p se relaciona con *ESR1* y 221-3p se asocia con *SOD 2* y *ESR1*.

- Los resultados sugieren que miR-27a se asocia con miR-193b y que *SOD2* (miR-93-5p y miR193b), *GPXI* (miR-221-3p) y *NAT2* (miR-27a) son biomarcadores prometedores para incluir futuros estudios.
- Se encuentran niveles significativamente mayores de BaP y BPA en pacientes con CaV respecto a los controles. Los varones presentan niveles significativamente mayores de NPh que las mujeres.
- *PONI* y *CYP17A1* presentan mayores valores de BPA y BaP respectivamente. Es la primera vez que se estudia la relación sobre variantes genéticas de enzimas xenobióticas y antioxidantes con exposiciones a químicos.
- La edad se asocia con un riesgo aumentado de padecer un CaV de alto grado y una menor probabilidad de que se trate de un Ta de bajo grado.
- Los pacientes expuestos a polvo tienen menor riesgo de presentar un tumor superficial, mientras que la realización de ejercicio físico regular se asocia a una mayor probabilidad de padecer un Ta de bajo grado frente a otros estadios tumorales más agresivos. No se encontró asociación entre tabaquismo y las variables patológicas.
- El consumo de dietas ricas en grasas se asocia a una menor probabilidad de tener un tumor superficial.
- Todos estos datos abren un nuevo escenario sobre el uso de biomarcadores no invasivos en el diagnóstico y la estadificación del CaV, lo cual, en la práctica clínica habitual, se ha vuelto una necesidad urgente dentro del campo de la medicina personalizada.

7. **BIBLIOGRAFÍA:**

1-. IARC, Cancer Today. Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. 2021 [internet; consultado marzo 2021]. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>

2-. Burger M, Catto JW, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2013;63(2):234-41.

3-. Steliarova-Foucher E, O'Callaghan M, Ferlay J, Masuyer E, Forman D, Comber H, et al. European Cancer Observatory: Cancer incidence, mortality, prevalence and survival in europe. Version 10 (Septiembre 2012). European Network of Cancer Registries. International Agency for Researchon Cancer. 2014. [internet; consultado Abr 2014]. <http://eco.iarc.fr>

4-. Cózar JM, Miñana B, Palou-Redortac J, Medina RA, de la Rosa-Kehrmanne F, Lozano-Palacio F, et al. Análisis comparativo de la incidencia de cáncer de vejiga en las comunidades de Andalucía, Cataluña y Comunidad de Madrid en el año 2011. *Actas Urol Esp*. 2015;39(7):420-8.

5-. Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. 2000;86(2):289-94.

6-. Boffetta P. Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 2008;218:45–54.

7-. 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*. 2005;366(9486):649–59.

8-. Kolostova K, Cegan M, Bobek V. Circulating tumor cells in patients with urothelial tumors: Enrichment and in vitro culture. *Canadian Urological Association Journal*. 2014;8(9-10):E715.

9-. Bellmunt J, Werner L, Leow JJ, Mullane SA, Fay AP, Riestter M, et al. Somatic copy number abnormalities and mutations in PI3K/AKT/mTOR pathway have prognostic significance for overall survival in platinum treated locally advanced or metastatic urothelial tumors. *PloS one*. 2015;10(6):e0124711.

10-. Raimondi C, Gradilone A, Gazzaniga P. Circulating tumor cells in early bladder cancer: Insight into micrometastatic disease. *Expert review of molecular diagnostics*. 2014;14(4):407-9.

11-. Nagata M, Muto S, Horie S. Molecular Biomarkers in Bladder Cancer: Novel Potential Indicators of Prognosis and Treatment Outcomes. *Dis Markers*. 2016;2016:8205836.

12-. Togneri FS, Ward DG, Foster JM, Devall AJ, Wojtowicz P, Alyas S, et al. Genomic complexity of urothelial bladder cancer revealed in urinary cfDNA. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(8):1167-74.

13-. Sharma P, Callahan MK, Bono P, Kim J, Spiliopoulou P, Calvo E, et al. Nivolumab monotherapy in recurrent metastatic urothelial carcinoma (CheckMate 032):

a multicentre, open-label, two-stage, multi-arm, phase 1/2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(11):1590-8.

14-. Anantharaman A, Friedlander T, Lu D, Krupa R, Premasekharan G, Hough J, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC Cancer.* 2016;16(1):744.

15-. 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. *Lancet.* 2016;387(10031):1909-20.

16-. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Boucher P, Mamelle N. Mediterranean dietary pattern in a randomized trial: prolonged survival and possible reduced cancer rate. *Arch Intern Med.* 1998;158(11):1181-7.

17-. Brinkman M, Zeegers MP. Nutrition, total fluid and bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008;218:25–36.

18-. Sun M, Trinh QD. Diagnosis and Staging of Bladder Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2015;29(2):205-18.

19-. Chapple Christopher R., Steers William D. *Practical Urology Essential Principles and Practice.* (Springer,ed.);2011. <https://drive.google.com/file/d/1Xq6VQ2-ZPq0qWyX4hy1laf1iEOuS0KbI/view>. Consultado Mayo 2019.

20- Raitanen MP, Aine R, Rintala E, Kallio J, Rajala P, Juusela H, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. *Eur Urol.* 2002;41(3):284-9.

- 21-. Karakiewicz PI, Benayoun S, Zippe C, Lüdecke G, Boman H, Sanchez-Carbayo M, et al. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int.* 2006;97(5):997-1001.
- 22-. Trinh TW, Glazer DI, Sadow CA, Sahni VA, Geller NL, Silverman SG. Bladder cancer diagnosis with CT urography: test characteristics and reasons for false-positive and false-negative results. *Abdom Radiol (NY)*. 2018;43(3):663-71.
- 23-. Care P. Bladder cancer: diagnosis and management of bladder cancer: NICE (2015). 2017:755-65.
- 24-. Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res.* 2015;141(4):389-97.
- 25-. Cui L, Sun MM, Zhao ZH, Yang JP, Zheng YP, He LL, et al. BLCA-4 and UBC combined detection for early diagnosis of bladder cancer. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2016;30(2):485-90.
- 26-. Palou J, Brausi M, Catto JWF. Management of Patients with Normal Cystoscopy but Positive Cytology or Urine Markers. *Eur Urol Oncol.* 2020;3(4):548-54.
- 27-. Ballesteros Ruiz C, Álvarez-Maestro M, Aguilera Bazán A, Martínez-Piñeiro L. Urinary biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Arch Esp Urol.* 2022;75(2):165-72.
- 28-. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2022. ISBN 978-94-92671-16-5.

29-. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 8th edn., G.M. Brierley JD, Wittekind C, Eds. 2017, Wiley-Blackwell and UICC: New York, USA.

30-. De Montironi R, Llopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol.* 2005;13(2):143-53.

31-. Herr HW. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. *J Urol.* 2000a;163:60–1; discussion 61–62.

32-. 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.

33-. Althausen AF, Prout Jr GR, Daly JJ. Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol.* 1976;116:575–80.

34-. Fernandez-Gomez J, Madero R, Solsona E, Unda M, Martinez-Piñeiro L, Gonzalez M, et al. Predicting nonmuscle invasive bladder cancer recurrence and progression in patients treated with bacillus Calmette-Guerin: the CUETO scoring model. *J Urol.* 2009 Nov;182(5):2195-203.

35-. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006 Mar;49(3):466-5; discussion 475-7.

36-. Sylvester RJ. Combining a molecular profile with a clinical and pathological profile: Biostatistical considerations. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* 2008;(218):185–90.

37-. Sylvester RJ, Rodríguez O, Hernández V, Turturica D, Bauerová L, Bruins HM, et al. European Association of Urology (EAU) Prognostic Factor Risk Groups for Non-muscle-invasive Bladder Cancer (NMIBC) Incorporating the WHO 2004/2016 and WHO 1973 Classification Systems for Grade: An Update from the EAU NMIBC Guidelines Panel. *Eur Urol.* 2021;79(4):480-8.

38-. Rosenberg JE, Carroll PR, Small EJ. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer. *J Urol.* 2005;174(1):14-20.

39-. Stenzl A, Cowan NC, De Santis M, Kuczyk MA, Merseburger AS, Ribal MJ et al. Treatment of Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Update of the EAU Guidelines. *Eur Urol.* 2011:1009–18.

40-. Sapre N, Anderson PD, Costello AJ, Hovens CM, Corcoran NM. Gene-based urinary biomarkers for bladder cancer: An unfulfilled promise? *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2014;32(1):48.e9-e17.

41-. Hong Z, Wu J, Li Q, Zhang S, Shi Z. Meta-Analysis Reveals no Significant Association between *ERCC6* Polymorphisms and Bladder Cancer Risk. *Int J Biol Markers.* 2017;32(1):113-7.

42-. Meng X-Y, Shi M-J, Chen J-F, Liao Y, Hu B-W, Hireche A. Association between the *TACC3* rs798766 Polymorphism and Risk of Urinary Bladder Cancer: A Synthesis Based on Current Evidence. *Dis Markers.* 2017;2017:7850708.

43-. Andrew AS, Gui J, Hu T, Wyszynski A, Marsit CJ, Kelsey KT, et al. Genetic polymorphisms modify bladder cancer recurrence and survival in a USA population-based prognostic study. *BJU Int.* 2015;115(2):238-47.

44-. Gao C, Zhuang J, Zhou C, Li H, Liu C, Liu L, et al. SNP mutation-related genes in breast cancer for monitoring and prognosis of patients: A study based on the TCGA database. *Cancer Med.* 2019;8(5):2303-12.

45-. Henríquez-Hernández LA, Valenciano A, Foro-Arnalot P, Álvarez-Cubero MJ, Cozar JM, Suárez-Novo JF, et al. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes as risk factors associated to prostate cancer progression. *BMC Med Genet.* 2014;15:143.

46-. Corfield A, Meyer P, Kassam S, Mikuz G, Sergi C. SNPs: At the origins of the databases of an innovative biotechnology tool. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:1-4.

47-. Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):238-50.

48-. Seal A, Gupta A, Mahalaxmi M, Aykkal R, Singh TR, Arunachalam V. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *Int J Bioinform Res Appl.* 2014;10(3):264.

49-. Preskill C, Weidhaas JB. SNPs in microRNA binding sites as prognostic and predictive cancer biomarkers. *Crit Rev Oncog.* 2013;18(4):327-40.

50-. 42. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget.* 2017;8(66):110635-49.

51-. Zhou T, Li H-Y, Xie W-J, Zhong Z, Zhong H, Lin Z-J. Association of Glutathione S-transferase gene polymorphism with bladder Cancer susceptibility. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1088.

52-. Selinski S. Discovering urinary bladder cancer risk variants: Status quo after almost ten years of genome-wide association studies. *EXCLI J*. 2017;16:1288-96.

53-. Zhu G, Su H, Lu L, Guo H, Chen Z, Sun Z, et al. Association of nineteen polymorphisms from seven DNA repair genes and the risk for bladder cancer in Gansu province of China. *Oncotarget*. 2016;7(21):31372-83.

54-. Janicka A, Szymańska-Pasternak J, Bober J. Polymorphisms in the oxidative stress-related genes and cancer risk. *Ann Acad Med Stetin*. 2013;59(2):18-28.

55-. Wei H, Kamat A, Chen M, Ke HL, Chang DW, Yin J, et al. Association of polymorphisms in oxidative stress genes with clinical outcomes for bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guérin. *PLoS One*. 2012;7(6):e38533.

56-. Lukas C, Selinski S, Prager H-M, Blaszkewicz M, Hengstler JG, Golka K. Occupational bladder cancer: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes, exposures, and prognosis. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2017;80(7-8):439-52.

57-. Klimčáková L, Habalová V, Sivoňová M, Nagy V, Šalagovič J, Ťidzik J. Effect of NAT2 gene polymorphism on bladder cancer risk in Slovak population. *Mol Biol Rep*. 2011;38(2):1287-93.

58-. Köberle B, Koch B, Fischer BM, Hartwig A. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2369-88.

59-. Martinez-Gonzalez LJ, Antúnez-Rodríguez A, Vazquez-Alonso F, Hernandez AF, Alvarez-Cubero MJ. Genetic variants in xenobiotic detoxification enzymes, antioxidant defenses and hormonal pathways as biomarkers of susceptibility to prostate cancer. *Sci. Total Environ.* 2020;730:138314.

60-. Cecerska-Heryć E, Surowska O, Heryć R, Serwin N, Napiontek-Balińska S, Dołęgowska, B. Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients – a review. *Clin. Biochem.* 2021;93:1-8.

61-. Teleka S, Hindy G, Drake I, Poveda A, Melander O, Liedberg F, et al. Blood pressure and bladder cancer risk in men by use of survival analysis and in interaction with NAT2 genotype, and by Mendelian randomization analysis. *PLoS One.* 2020;15(11):e0241711.

62-. Sarabandi S, Effatpanah H, Sereshki N, Samavarchi Tehrani S, Moradi-Sardareh H. 50-bp insertion/deletion polymorphism of the superoxide dismutase-1 is associated with bladder cancer risk in an Iranian population. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2022;41(2):154-65.

63-. Iftimie S, García-Heredia A, Pujol-Bosch F, Pont-Salvadó A, López-Azcona A.F, Hernández-Aguilera A, et al. Serum Paraoxonase-1 concentration as a potential predictor of urinary bladder cancer recurrence. A five year follow-up study. *Arch. Med. Res.* 2018;49(2):119-22.

64-. Gao L, Meng J, Yue C, Wu X, Su Q, Wu H, et al. Integrative analysis the characterization of peroxiredoxins in pan-cancer. *Cancer Cell Int.* 2021 Jul;21(1):366.

65-. Bernardo C, Monteiro FL, Direito I, Amado F, Afreixo V, Santos LL, et al. Association between estrogen receptors and GATA3 in bladder cancer: a systematic

review and meta-analysis of their clinicopathological significance. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2021;12:684140.

66-. Strehlow K, Rotter S, Wassmann S, Adam O, Grohé C, Laufs K, et al. 2003. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. 2003;93(2):170-7.

67-. Salvi S, Casadio V, Conteduca V, Burgio SL, Menna C, Bianchi E, et al. Circulating cell-free AR and CYP17A1 copy number variations may associate with outcome of metastatic castration-resistant prostate cancer patients treated with abiraterone. *Br J Cancer*. 2015;112(10):1717-24.

68-. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018;173:20–51.

69-. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19:92–105.

70-. Norouzi M, Yasamineh S, Montazeri M, Dadashpour M, Sheervalilou R, Abasi M, et al. Recent advances on nanomaterials-based fluorimetric approaches for microRNAs detection. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;104:110007.

71-. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.

72-. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012;482:347–55.

73-. He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *Int J Biol Sci*. 2020;16(14):2628-47.

74-. Omar HA, El-Serafi AT, Hersi F, Arafa EA, Zaher DM, Madkour M, et al. Immunomodulatory MicroRNAs in cancer: targeting immune checkpoints and the tumor microenvironment. *FEBS J.* 2019;286:3540–57.

75-. Zou MX, Guo KM, Lv GH, Huang W, Li J, Wang XB, et al. Clinicopathologic implications of CD8(+)/Foxp3(+) ratio and miR-574-3p/PD-L1 axis in spinal chordoma patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(2):209-24.

76-. Taheri M, Shirvani-Farsani Z, Ghafouri-Fard S, Omrani MD. Expression profile of microRNAs in bladder cancer and their application as biomarkers. *Biomed Pharmacother.* 2020;131:110703.

77-. Lin JT, Tsai KW. Circulating miRNAs Act as Diagnostic Biomarkers for Bladder Cancer in Urine. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4278.

78-. Sabo AA, Birolo G, Naccarati A, Dragomir MP, Aneli S, Allione A, et al. Small Non-Coding RNA Profiling in Plasma Extracellular Vesicles of Bladder Cancer Patients by Next-Generation Sequencing: Expression Levels of miR-126-3p and piR-5936 Increase with Higher Histologic Grades. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1507.

79-. Zhai X, Xu W. Long Noncoding RNA ATB Promotes Proliferation, Migration, and Invasion in Bladder Cancer by Suppressing MicroRNA-126. *Oncol Res.* 2018;26(7):1063-72.

80-. Lin SR, Yeh HC, Wang WJ, Ke HL, Lin HH, Hsu WC, et al. MiR-193b Mediates CEBPD-Induced Cisplatin Sensitization Through Targeting ETS1 and Cyclin D1 in Human Urothelial Carcinoma Cells. *J Cell Biochem.* 2017;118(6):1563-73.

81-. Lin H, Shi X, Li H, Hui J, Liu R, Chen Z, et al. Urinary Exosomal miRNAs as biomarkers of bladder Cancer and experimental verification of mechanism of miR-93-5p in bladder Cancer. *BMC Cancer*. 2021;21(1):1293.

82-. Ranjit S, Midde NM, Sinha N, Patters BJ, Rahman MA, Cory TJ, et al. Effect of Polyaryl Hydrocarbons on Cytotoxicity in Monocytic Cells: Potential Role of Cytochromes P450 and Oxidative Stress Pathways. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163827.

83-. Verma N, Pink M, Boland S, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke, S. Benzo[a]pyrene-induced metabolic shift from glycolysis to pentose phosphate pathway in the human bladder cancer cell line RT4. *Sci. Rep.* 7. 2017;1–14.

84-. Jorge BC, Reis ACC, Sterde ÉT, Balin PDS, Scarano WR, Hisano H, et al. Exposure to benzo(a)pyrene from juvenile period to peripubertal impairs male reproductive parameters in adult rats. *Chemosphere*. 2021;263:128016.

85-. Boada LD, Henríquez-Hernández LA, Navarro P, Zumbado M, Almeida-González M, Camacho M, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and bladder cancer: evaluation from a gene-environment perspective in a hospital-based case-control study in the Canary Islands (Spain). *Int J Occup Environ Health*. 2015;21(1):23-30.

86-. Alwadi D, Felty Q, Roy D, Yoo C, Deoraj A. Environmental Phenol and Paraben Exposure Risks and Their Potential Influence on the Gene Expression Involved in the Prognosis of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3679.

87-. Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_053238.pdf. Consultado Junio 2019.

88-. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta*. 2015;439:231-50.

89-. Oliveira MC, Caires HR, Oliveira MJ, Fraga A, Vasconcelos MH, Ribeiro R. Urinary Biomarkers in Bladder Cancer: Where Do We Stand and Potential Role of Extracellular Vesicles. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6):1400.

90-. Soria F, Droller MJ, Lotan Y, Gontero P, D'Andrea D, Gust KM, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2018;36(12):1981-95.

91-. Califf R.M. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 2018;243:213–21.

92-. Shim JS, Kang S-G. Surveillance for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. In: Ku JH editor. *Bladder Cancer*. 1st ed. Academic Press; London, UK: 2018. pp. 541–51.

93-. Tabayoyong W, Kamat AM. Current Use and Promise of Urinary Markers for Urothelial Cancer. *Curr Urol Rep*. 2018;19:96.

94-. Santoni G, Morelli MB, Amantini C, Battelli N. Urinary markers in bladder cancer: An update. *Front Oncol*. 2018;8:362.

95-. Guo A, Wang X, Gao L, Shi J, Sun C, Wan Z. Bladder tumour antigen (BTA stat) test compared to the urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: A meta-analysis. *J Can Urol Assoc*. 2014;8:E347–52.

96-. Wiecek E, Jablonowski Z, Tomasik B, Gromadzinska J, Jablonska E, Konecki T, et al. Different Gene Expression and Activity Pattern of Antioxidant Enzymes in Bladder Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37(2):841-8.

97-. Goto T, Miyamoto H. The Role of Estrogen Receptors in Urothelial Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:643870.

98-. Li Y, Li G, Guo X, Yao H, Wang G, Li C. Non-coding RNA in bladder cancer. *Cancer Lett.* 2020;485:38-44.

99-. Lv J, Chang PA, Li X, Yang X, Han J, Yu H, et al. Identification of the circRNA-miRNA-mRNA Regulatory Network in Bladder Cancer by Bioinformatics Analysis. *Int J Genomics.* 2021;2021:9935986.

100-. Saito Y, Friedman JM, Chihara Y, Egger G, Chuang JC, Liang G. Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(3):726-31.

101-. Jia AY, Castillo-Martin M, Bonal DM, Sánchez-Carbayo M, Silva JM, Cordon-Cardo C. MicroRNA-126 inhibits invasion in bladder cancer via regulation of ADAM9. *Br J Cancer.* 2014;110(12):2945-54.

102-. Tan W, Li Z, Xia W, Zhu J, Fan R. miR-221-3p regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration and invasion via targeting LIFR. *Ann Hepatol.* 2022;27 Suppl 1:100567.

103-. Li Z, Jiang L, Zhang Z, Deng M, Wei W, Tang H, et al. Long noncoding RNAs to predict postoperative recurrence in bladder cancer and to develop a new molecular classification system. *Cancer Med.* 2022;11(2):539-52.

104-. Svendsen C, James A, Matulewicz RS, Moreton E, Sosnowski R, Sherman S, et al. Carcinogenic biomarkers of exposure in the urine of heated tobacco product users associated with bladder cancer: A systematic review. *Urol Oncol*. 2022;40(4):149-60.

105-. Mallah MA, Changxing L, Mallah MA, Noreen S, Liu Y, Saeed M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overreview. *Chemosphere*. 2022;296:133948.

106-. Tyagi H, Daulton E, Bannaga AS, Arasaradnam RP, Covington JA. Urinary Volatiles and Chemical Characterisation for the Non-Invasive Detection of Prostate and Bladder Cancers. *Biosensors (Basel)*. 2021;11(11):437.

107 -. Pellerin E, Caneparo C, Chabaud S, Bolduc S, Pelletier M. Endocrine-disrupting effects of bisphenols on urological cancers. *Environ Res*. 2021;195:110485.

108-. Pellerin È, Chabaud S, Pouliot F, Pelletier M, Bolduc S. Bisphenol A Alters the Energy Metabolism of Stromal Cells and Could Promote Bladder Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 2021;13(21):5461.

ANEXO 1: MATERIAL
SUPLEMENTARIO.

Tabla S1: SNPs asociados con riesgo de CaV.

<i>Gen</i>	<i>SNPs</i>	<i>Referencia</i>
<i>TP63</i> (tumor protein 63) 3q28	rs710521[A] (intergenic)	<i>Kiemency et al. (2008).</i>
<i>CLPTMIL</i> (cisplatin resistance related protein CRR9p) <i>TERT</i> (telomerase reverse transcription) 5p15.33	rs401681[C] (intron) rs2736098[A] (exon)	<i>Rafnar et al. (2009).</i>
<i>UGT1A</i> (UDP glucuronosyl-transferase 1 family, polypeptide A complex locus) 2q37.1	rs11892031[C] (intron)	<i>Rothman et al. (2010), Selinski et al. (2012), Garcia-Closas et al. (2013).</i>
	rs17863783[T] (exon variant)	<i>Tang et al. (2012), Garcia-Closas et al. (2013).</i>
<i>NAT2</i> (N-acetyltransferase 2) 8p22	rs1495741[A/A] (intergenic)	<i>Rothman et al. (2010), Selinski et al. (2011), Garcia-Closas et al. (2013), Grotenhuis et al. (2014), Wang et al. (2014).</i>
<i>PSCA</i> (prostate stem cell antigen) 8q24.3	rs2294008[T] (start codon)	<i>Wu et al. (2009), Fu et al. (2012), Garcia-Closas et al. (2013), Wang et al. (2014).</i>
	rs2978974[A] (exon)	<i>Fu et al. (2012).</i>
<i>TACC3</i> (transforming, acidic coiled-coil containing protein 3) <i>FGFR3</i> (fibroblast growth factor receptor 3) 4p16.3	rs798766[T] (intron)	<i>Kiemency et al. (2010), Garcia-Closas et al. (2013), Grotenhuis et al. (2014), Wang et al. (2014).</i>
<i>MYC</i> (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) 8q24.21)	rs9642880[T] (intergenic)	<i>Kiemency et al. (2008), Golka et al. (2009), Garcia-Closas et al. (2013), Grotenhuis et al. (2014), Wang et al. (2014).</i>
<i>SLC14A1</i> (solute carrier family 14 urea transporter, member 1 Kidd blood group) 18q12.3	rs1058396[G] (exon)	<i>Rafnar et al. (2011), Garcia-Closas et al. (2011).</i>
	rs17674580[T] (intron)	<i>Rafnar et al. (2011).</i>
	rs7238033[T], rs10853535[C]	<i>Garcia-Closas et al. (2011)</i>
<i>CCNE1</i> (cyclin E1) 19q12	rs8102137[C] (intergenic)	<i>Rothman et al. (2010)</i>
<i>CBX6</i> (chromobox homolog 6) <i>APOBEC3A</i> (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide like 3A)	rs1014971[T] (intergenic)	<i>Rothman et al. (2010), Garcia-Closas et al. (2013).</i>
<i>TERC</i> (telomerase RNA component) <i>ACTRT3</i> (actin related protein T3) <i>MYNN</i> (myoneurin) <i>LRRC34</i> (leucine rich repeat containing 34) 3q26.2	rs10936599[C] (intergenic)	<i>Figuroa et al. (2014), Wang et al. (2014).</i>
<i>LSP1</i> (lymphocyte specific protein 1, longer transcript) 11p15.5	rs907611[A] (transcription start site)	<i>Figuroa et al. (2014).</i>
<i>JAG1</i> (jagged 1) 20p12.2	rs6104690[A] (intergenic)	<i>Figuroa et al. (2014).</i>
	rs62185668[A], rs4813953[T], rs148953085 (all intergenic).	<i>Rafnar et al. (2014)</i>
	rs6108803 (intergenic)	<i>Figuroa et al. (2016)</i>
<i>MCF2L</i> (MCF.2 cell line derived transforming sequence like) 13q34	rs4907479 (intron)	<i>Figuroa et al. (2016).</i>

Pie de Tabla S1: Polimorfismos con asociación confirmada para el riesgo de BCa. Se muestran los genes implicados, su localización, los SNPs asociados y las respectivas referencias. (*Modificado de Selinski S. Discovering urinary bladder cancer risk variants: Status quo after almost ten years of genome-wide association studies. EXCLI J. 2017;16:1288-1296*).

Tabla S2: Tabla resumen de los SNPs seleccionados.

POLIMORFISMOS	FUNCIÓN	PAPEL EN CaV	RELACIÓN CON OTROS CÁNCERES
NAT 2	Codifica una enzima de fase II de biotransformación que actúa en la detoxificación de xenobióticos que contienen aminas aromáticas.	Los “acetiladores lentos” se han asociado al CaV, además de que la interacción de esta variante con el humo del tabaco es un factor de riesgo bien conocido para dicho cáncer.	<ul style="list-style-type: none"> - Colorrectal. - Pulmón. - Tiroides.
SOD 1	Enzima antioxidante y catalizador de radicales libres.	En asociación con factores ambientales se ha asociado a mayores tasas en el riesgo de padecer CaV.	<ul style="list-style-type: none"> - Gástrico. - Pulmón. - Ovario.
PON 1	Paraoxonasa que hidroliza derivados organofosfatados, previene la oxidación de lipoproteínas e hidroliza la homocisteína tiolactona.	Una baja concentración plasmática y baja actividad de esta enzima se han descrito en pacientes con CaV. además los niveles plasmáticos bajos se han propuesto como un marcador de alta sensibilidad para detectar recidiva tumoral.	<ul style="list-style-type: none"> - Mama.
PRDXs	Efectores involucrados en la protección celular contra el estrés oxidativo.	Papel importante en la aparición y desarrollo de CaV.	<ul style="list-style-type: none"> - Pulmón. - Hepatocarcinoma. - Renal.
ESR1	Codifica el receptor estrogénico alfa, y puede modular la expresión de enzimas antioxidantes.	Implicado en el desarrollo de tumores vesicales, más aún en aquellos de alto grado.	<ul style="list-style-type: none"> - Mama.
CYP17A1	Cataliza la formación de andrógenos endógenos.	No estudiado.	<ul style="list-style-type: none"> - Próstata.

Tabla S3: Análisis de regresión logística múltiple para valorar los efectos de las variantes genéticas estudiadas (SNPs, CNV) sobre parámetros asociados a la agresividad de CaV (número de tumores, grado, estadio Ta bajo grado, tumor superficial o no, presencia de metastasis).

	Numero de tumores (n=98)	<i>p</i> *	Grado (n=97)	<i>p</i> *	Ta (bajo Grado) (n=97)	<i>p</i> *	Superficial (n=98)	<i>p</i> *	Metástasis (n=98)	<i>p</i> *
NAT2_rs1801280_CCvsT	0.31 (0.10-0.96)	0.043	0.39 (0.10-1.47)	0.165	3.40 (0.67-17.26)	0.139	0.36 (0.08-1.52)	0.164	0.38 (0.06-2.45)	0.308
GPX1_rs1050450_AAvsG	0.87 (0.21-3.64)	0.849	0.71 (0.15-3.49)	0.678	0.94 (0.19-4.63)	0.936	1.20 (0.31-4.57)	0.793	1.44 (0.19-10.65)	0.721
SOD2_rs4880_AAvsG	1.13 (0.37-3.44)	0.833	4.78 (1.61-14.20)	0.005	0.30 (0.10-0.90)	0.032	0.55 (0.16-1.84)	0.329	5.16 (0.52-51.46)	0.162
PON1_rs662_TTvsC	2.23 (0.80-6.19)	0.125	1.74 (0.62-4.87)	0.295	0.82 (0.28-2.43)	0.719	1.49 (0.52-4.25)	0.454	0.17 (0.03-1.11)	0.065
CYP17A1_rs743572_AAvsG	1.65 (0.46-5.90)	0.439	0.68 (0.17-2.67)	0.580	1.09 (0.23-5.07)	0.913	0.70 (0.20-2.42)	0.577	0.44 (0.06-3.16)	0.414
ESR1_rs746432_GGvsC	0.31 (0.3-3.33)	0.334	0.11 (0.01-0.77)	0.027	6.58 (0.95-45.65)	0.057	-	0.999	-	0.999
CAT_rs1001179_CCvsT	0.80 (0.26-2.44)	0.693	0.66 (0.23-1.93)	0.449	1.72 (0.56-5.26)	0.344	1.38 (0.43-4.36)	0.587	1.68 (0.30-9.55)	0.559
PRDX3_rs3740562_AAvsG	0.70 (0.11-4.67)	0.717	4.12 (0.68-24.94)	0.123	0.20 (0.03-1.27)	0.089	0.54 (0.05-5.72)	0.608	0.29 (0.02-4.47)	0.372
TXNRD1_rs7310505_CCvsA	1.57 (0.54-4.52)	0.408	2.08 (0.70-6.16)	0.184	0.70 (0.23-2.16)	0.535	0.58 (0.19-1.80)	0.347	3.32 (0.61-16.97)	0.168
SOD1_rs10432782_GGvsT	3.14 (0.54-18.09)	0.201	1.01 (0.23-4.52)	0.987	1.80 (0.30-10.80)	0.520	1.25 (0.24-6.56)	0.789	3.64 (0.20-67.37)	0.385
GPX1_rs17650792_GGvsA	1.08 (0.36-3.26)	0.894	1.61 (0.57-4.57)	0.370	0.87 (0.28-2.66)	0.809	0.40 (0.11-1.42)	0.156	2.27 (0.33-15.47)	0.404

* Análisis de regresión logística múltiple de la agresividad de los CaV ajustados por NAT2_rs1801280_CCvsT, GPX1_rs1050450_AAvsG, SOD2_rs4880_AAvsG, PON1_rs662_TTvsC, CYP17A1_rs743572_AAvsG, ESR1_rs746432_GGvsC, PRDX3_rs3740562_AAvsG, CAT_rs1001179_CCvsT, TXNRD1_rs7310505_CCvsA, SOD1_rs10432782_GGvsT, GPX1_rs17650792_GGvsA.

Variables no analizadas: ESR1 y los tumores superficiales (ningún tumor vesical músculo-invasivo o metastásico tuvo genotipos CC o CG (alelo C)).

Tabla S4: Análisis de correlación de los miRNAs estudiados.

	miR-126	miR-27a	miR-193b	miR-193a	miR-93-5p	miR-221-3p
miR-126	-					
miR-27a	0.597*	-				
miR-193b	0.528*	0.467	-			
miR-193a	0.731**	0.564*	0.839**	-		
miR-93-5p	-0.025	0.199	0.235	0.146	-	
miR-221-3p	0.580*	0.343	0.725**	0.823**	0.086	-

Pie de Tabla S4: Los datos representan el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Los datos de miRNAs ($n=17$) se expresan categóricamente como mínima, moderada, alta y máxima expresión (1^{er}, 2^o, 3^o and 4^o cuartil, respectivamente).

Tabla S5: Expresión de los miRNA estudiados en CaV Vs controles.

	CaV n (%)	Controles n (%)	<i>p</i>-valor*
miR-126			0.041
Baja	2 (25.0%)	6 (75.0%)	
Alta	6 (87.5%)	1 (14.3%)	
miR-27a			0.008
Baja	0 (0%)	11 (100%)	
Alta	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
miR-193b			0.001
Baja	0 (0%)	8 (100%)	
Alta	8 (80%)	2 (20%)	
miR-193a			0.072
Baja	6 (28.6%)	15 (71.4%)	
Alta	7 (63.6)	4 (36.4%)	
miR-93-5p			0.010
Baja	5 (29.4%)	12 (70.6%)	
Alta	10 (76.9%)	3 (23.1%)	
miR-221-3p			0.088
Baja	6 (28.6%)	15 (71.4%)	
Alta	10 (55.6%)	8 (44.4%)	

Pie de Tabla S5: * Chi Cuadrado o test exacto de Fisher. Alta: alta expresión. Baja: baja expresión

Tabla S6: Niveles de contaminantes (ng/mL) estudiados estratificados por cáncer, sexo, exposición y estilos de vida.

	Benzo(a)pyrene Median (IQR)	Naphthalene Median (IQR)	Bisphenol A Median (IQR)	Ethyl-paraben Median (IQR)
CaV				
Si	49.9 (37.8-62.0) **	1.36 (0.88-2.97)	17.6 (13.2-22.9) **	50.7 (33.4-90.4)
No	21.1 (17.9-23.3)	1.62 (1.32-2.69)	3.60 (2.35-5.60)	-
Sexo				
Varón	35.8 (22.0-60.0)	1.68 (1.23-3.02) *	11.9 (3.7-22.1)	50.7 (30.1-99.7)
Mujer	21.1 (18.9-37.6)	0.90 (0.66-1.17)	8.55 (2.45-13.9)	59.5 (40.1-78.9)
Humo				
Si	20.9 (16.6-46.0)	1.30 (0.96-1.95)	8.80 (3.48-17.1)	55.1 (31.2-78.9)
No	25.0 (19.8-42.7)	1.56 (0.96-2.80)	4.95 (2.43-14.03)	94.2 (70.4-105.2)
Polvo				
Si	22.7 (16.6-48.8)	1.56 (1.05-2.42)	4.65 (2.90-15.07)	70.4 (46.5-94.2)
No	24.6 (19.6-39.6)	1.41 (0.96-2.80)	5.30 (2.75-14.23)	78.9 (55.1-97.6)
Humo y/o polvo				
Si	23.6 (18.8-53.1)	1.23 (0.91-2.06)	11.9 (3.35-18.0)	62.7 (35.0-90.4)
No	22.9 (19.1-34.8)	1.32 (1.01-3.13)	4.80 (2.45-11.75)	-
Tóxicos				
Si	25.7 (21.7-29.7)	21.3 (2.58-40.0)	6.3 (3.6-9.0)	-
No	23.6 (19.8-42.5)	1.32 (1.01-2.34)	5.1 (2.80-14.0)	78.9 (38.9-105.2)
Radiación				
Si	29.7 (21.4-37.8)	2.69 (2.48-40.0) **	4.80 (2.55-15.75)	-
No	23.3 (18.9-45.3)	1.22 (0.80-1.65)	5.30 (2.65-14.23)	62.7 (35.0-106.9)
Tabaco				
Si	20.1 (15.7-42.7)	1.09 (0.80-1.65)	5.70 (3.45-21.4)	-
No	23.6 (20.3-42.5)	1.56 (1.07-2.66)	5.10 (2.45-13.00)	78.9 (38.9-105.2)
Alcohol				
Si	22.9 (18.9-46.3)	1.62 (1.20-2.58)	5.30 (2.65-12.43)	70.4 (35.0-110.7)
No	27.0 (18.2-38.0)	1.02 (0.64-20.75)	9.10 (3.30-20.86)	-

Pie de Tabla S6: Test U Mann-Whitney: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$
 - (no se realizó análisis estadístico por no haber o haber un solo valor en la celda)

Tabla S7: Niveles de contaminantes (ng/mL) estudiados según las variantes genéticas.

	BaP	NPh	BPA	EPB
	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)	Mediana (IQR)
NAT2	<i>p</i> =0.681	<i>p</i> =0.905	<i>p</i> =0.868	<i>p</i> =0.629
CC	53.0 (32.3-62.9)	1.23 (1.02-3.56)	14.5 (7.3-22.9)	31.2 (28.9-73.3)
CT	38.0 (30.4-48.7)	1.90 (0.68-9.18)	13.4 (6.9-19.0)	62.7 (43.3-86.6)
TT	26.3 (21.1-61.2)	1.56 (1.24-4.40)	5.5 (3.5-25.4)	-
GPXI rs1050450	<i>p</i> =0.572	<i>p</i> =0.338	<i>p</i> =0.509	<i>p</i> =0.857
AA	42.7 (27.8-59.5)	0.80 (0.70-1.21)	9.05 (4.23-14.03)	-
AG	36.2 (20.7-45.1)	2.29 (1.23-2.69)	12.0 (4.0-22.6)	40.1 (35.7-67.2)
GG	40.4 (25.9-66.6)	1.50 (1.13-6.33)	14.1 (8.2-21.3)	66.9 (40.8-97.6)
SOD2	<i>p</i> =0.981	<i>p</i> =0.127	<i>p</i> =0.723	<i>p</i> =0.114
AA	40.4 (28.8-52.3)	1.90 (0.93-2.36)	14.0 (6.8-22.3)	86.6 (59.5-105.2)
AG	35.8 (20.4-62.3)	1.28 (0.96-2.00)	11.9 (4.5-19.9)	31.2 (28.9-38.9)
GG	37.2 (30.4-57.0)	11.2 (5.0-40.0)	18.4 (6.9-32.0)	-
PON1	<i>p</i> =0.335	<i>p</i> =0.319	<i>p</i>=0.014	<i>p</i> =0.057
CC	32.3 (25.3-38.4)	2.75 (2.37-3.13)	3.80 (3.10-13.15)	-
CT	41.8 (37.6-56.5)	1.26 (0.80-2.34)	22.1 (14.3-23.1) ^a	78.9 (66.9-97.6) ^b
TT	31.1 (22.1-61.7)	1.50 (1.23-6.95)	9.0 (5.1-12.6)	35.7 (28.9-43.3)
CYP17A1	<i>p</i>=0.043	<i>p</i> =0.457	<i>p</i> =0.175	
AA	45.7 (33.4-62.5) ^c	1.49 (1.02-2.36)	14.3 (8.5-22.8)	54.9 (31.2-94.2)
AG	31.1 (19.4-38.0)	2.38 (0.59-18.4)	9.00 (4.80-18.4)	-
ESR1	<i>p</i> =0.175	<i>p</i> =0.505	<i>p</i> =0.342	<i>p</i> =0.182
CG	49.7 (36.5-62.9)	1.07 (0.90-1.23)	12.0 (11.9-12.0)	35.7 (31.2-40.1)
GG	37.6 (24.2-52.9)	1.96 (1.02-3.95)	13.7 (5.0-20.9)	66.9 (46.5-94.2)
CAT	<i>p</i> =0.681	<i>p</i> =0.796	<i>p</i> =0.554	<i>p</i> =0.773
CC	39.2 (25.3-61.3)	1.50 (1.01-4.77)	13.0 (3.8-20.4)	50.7 (35.0-72.9)
CT	37.2 (24.9-52.3)	1.80 (0.98-2.36)	16.8 (6.2-22.3)	67.2 (30.0-110.7)
PRDX3	<i>p</i> =0.617	<i>p</i> =0.785	<i>p</i> =0.743	<i>p</i> =0.229
AA	36.5 (28.8-39.2)	2.29 (1.60-2.49)	12.0 (6.8-17.1)	-
AG	36.5 (25.9-56.4)	2.34 (1.32-4.77)	15.5 (6.2-22.7)	94.2 (70.4-105.2)
GG	43.7 (28.7-62.1)	1.23 (1.02-2.38)	13.7 (5.2-15.7)	43.1 (28.9-66.9)
TXNRD1	<i>p</i> =0.570	<i>p</i> =0.579	<i>p</i> =0.072	<i>p</i>=0.053
AC	34.8 (26.3-61.7)	1.41 (0.91-2.59)	10.5 (4.6-17.2) ^d	31.2 (28.9-38.9) ^e
CC	42.5 (36.0-58.2)	2.34 (1.01-4.77)	16.9 (12.4-22.9)	78.9 (54.9-94.2)

SOD1	$p=0.216$	$p=0.312$	$p=0.613$	
GG	64.4 (38.0-90.7)	0.89 (0.54-1.23)	15.4 (14.0-16.8)	-
TT	38.8 (28.0-56.5)	1.96 (1.02-3.95)	13.0 (5.2-22.3)	54.9 (40.1-94.2)
GPXI rs17650792	$p=0.397$	$p=0.451$	$p=0.307$	$p=0.381$
AA	32.3 (24.2-52.9)	1.62 (0.8-11.2)	5.50 (4.30-17.1)	-
AG	40.4 (20.3-54.9)	1.23 (1.01-2.37)	13.4 (4.9-22.3)	40.1 (31.2-78.9)
GG	60.0 (33.9-66.6)	2.34 (1.02-24.77)	14.1 (11.5-33.7)	85.6 (54.9-116.2)

Pie de Tabla S7: Los P -valores dados corresponden al test de Kruskal-Wallis test o U de Mann-Whitney según corresponda:

^a $p=0.002$ para PON1 CT vs. TT; ^b $p=0.057$ para PON1 CT vs. TT

^c $p=0.044$ para CYP17A1 AA vs. AG

^d $p=0.053$ para TXNRD1 AC vs. CC; ^e $p=0.071$ para TXNRD1 AC vs. CC

- (no se realizó análisis estadístico por no haber o haber un solo valor en la celda)

Tabla S8: Efectos de factores socioeconómicos, de estilos de vida, ambientales y dietéticos sobre parámetros asociados a la agresividad de CaV (número de tumores, grado, estadio Ta bajo grado, tumor superficial o no, presencia de metástasis), empleando un análisis de regresión logística binario.

	Número de tumores (>1 Vs 1; n=99)	<i>p</i> *	Grado (alto Vs bajo; n=98)	<i>p</i> *	Ta bajo grado (si Vs no, n=98)	<i>p</i> *	Superficial (si Vs no; n=99)	<i>p</i> *	Metástasis (si Vs no, n=99)	<i>p</i> *
Edad	1.01 (0.97-1.05)	0.629	1.07 (1.03-1.12)	0.002	0.94 (0.90-0.98)	0.004	0.96 (0.91-1.01)	0.099	1.04 (0.97-1.12)	0.312
Sexo (mujer vs. varón)	0.52 (0.16-1.71)	0.283	1.11 (0.40-3.07)	0.834	0.82 (0.27-2.53)	0.734	0.61 (0.21-1.73)	0.350	0.86 (0.17-4.39)	0.859
Tabaquismo	0.46 (0.15-1.40)	0.169	0.74 (0.28-1.95)	0.537	1.54 (0.56-4.25)	0.406	0.46 (0.16-1.31)	0.143	2.84 (0.70-11.60)	0.146
Alcohol	0.59 (0.21-1.64)	0.313	0.74 (0.26-2.07)	0.563	1.30 (0.44-3.85)	0.637	1.43 (0.48-4.21)	0.520	0.18 (0.04-0.79)	0.023
Extabaquismo	1.79 (0.64-5.07)	0.268	0.68 (0.26-1.81)	0.440	1.41 (0.51-3.90)	0.506	2.07 (0.71-5.99)	0.182	0.21 (0.04-1.09)	0.063
Exposición a polvo	0.71 (0.25-2.01)	0.519	0.64 (0.24-1.68)	0.362	1.43 (0.51-3.95)	0.496	0.33 (0.11-0.95)	0.040	1.39 (0.34-5.62)	0.649
Exposición a humo	1.99 (0.66-6.06)	0.224	0.91 (0.30-2.77)	0.861	1.53 (0.49-4.80)	0.462	3.02 (0.63-14.56)	0.168	-	.
Exposición a polvo y/o humo	0.89 (0.33-2.39)	0.822	0.74 (0.29-1.91)	0.532	1.35 (0.50-3.68)	0.553	0.58 (0.20-1.64)	0.302	0.87 (0.22-3.51)	0.846
Exposición a otros químicos	0.71 (0.25-2.01)	0.519	1.13 (0.42-3.02)	0.806	0.76 (0.27-2.17)	0.610	0.58 (0.21-1.66)	0.312	2.30 (0.57-9.35)	0.244
Exposición a radiaciones ionizantes	1.06 (0.19-5.91)	0.947	0.59 (0.12-2.85)	0.508	1.12 (0.20-6.24)	0.901	0.37 (0.08-1.85)	0.228	1.35 (0.14-12.73)	0.791
Consumo de cerveza (>3/sem)	0.60 (0.21-1.71)	0.342	1.75 (0.62-4.96)	0.291	0.64 (0.21-1.91)	0.418	0.80 (0.28-2.32)	0.679	0.71 (0.17-3.10)	0.653
Consumo de vino (>3/sem)	1.33 (0.45-3.94)	0.603	0.68 (0.24-1.97)	0.482	1.58 (0.52-4.74)	0.417	0.76 (0.24-2.37)	0.639	1.26 (0.29-5.57)	0.758
Consumo de destilados (>1/sem)	0.52 (0.17-1.53)	0.234	1.12 (0.40-3.14)	0.834	0.77 (0.25-2.38)	0.653	1.58 (0.52-4.74)	0.418	0.16 (0.02-1.38)	0.097
Ejercicio físico (>45 min)	0.50 (0.17-1.45)	0.203	0.54 (0.21-1.40)	0.204	2.89 (1.05-7.96)	0.040	1.37 (0.46-4.09)	0.574	0.83 (0.19-3.61)	0.807
Dieta equilibrada (si vs. no)	1.97 (0.58-6.65)	0.275	0.86 (0.29-2.57)	0.783	1.71 (0.50-5.85)	0.389	1.45 (0.47-4.47)	0.522	-	-
Dieta rica en frutas y verduras	2.57 (0.77-8.59)	0.126	1.22 (0.44-3.43)	0.701	1.04 (0.34-3.12)	0.949	1.10 (0.36-3.35)	0.863	3.83 (0.45-32.50)	0.218
Dieta rica en proteínas	0.92 (0.30-2.80)	0.887	1.00 (0.33-3.02)	0.994	1.02 (0.32-3.28)	0.960	2.15 (0.71-6.57)	0.178	2.92 (0.34-24.95)	0.327
Dieta rica en azúcares	0.924 (0.32-2.64)	0.882	1.00 (0.36-2.78)	0.995	0.58 (0.19-1.81)	0.347	0.66 (0.22-1.97)	0.454	3.13 (0.76-12.84)	0.114
Dieta rica en lípidos	0.70 (0.25-1.96)	0.493	1.64 (0.58-4.59)	0.349	0.48 (0.15-1.48)	0.199	0.30 (0.11-0.88)	0.028	2.45 (0.60-9.96)	0.211

*Análisis de regresión logística binario no ajustado

ANEXO 2: CUESTIONARIO

ESTILOS DE VIDA.



CUESTIONARIO: “INTERACCIÓN AMBIENTE GENOTIPO EN CÁNCER DE VEJIGA”

CODIGO DE LA MUESTRA:	
------------------------------	--

Marque con un aspa o complete con una palabra el hueco _____

ANTECEDENTES FAMILIARES CON CÁNCER:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Tipo de cáncer:	_____
Relación Familiar	_____

LUGAR DE TRABAJO:
Minería <input type="checkbox"/> Agricultura <input type="checkbox"/> Ganadería <input type="checkbox"/> Otro _____

EXPOSICIÓN AMBIENTAL (Por su trabajo, por su vivienda, por sus hábitos).				
Humo SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Polvo SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Tóxicos SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Radiación SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Otro: _____

TABACO		
Fumador SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Exfumador SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Ha convivido con fumador SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Número de años: _____	Número de cajetillas día: más de 2 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 1/2 <input type="checkbox"/>	

CONSUMO DE ALCOHOL:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Cerveza (33cl/Semana)	Menos de 3 <input type="checkbox"/> entre 3 y 9 <input type="checkbox"/> más de 9 <input type="checkbox"/>
Vino (20cl/Semana)	Menos de 3 <input type="checkbox"/> entre 3 y 9 <input type="checkbox"/> más de 9 <input type="checkbox"/>
Copas (destilados)	Menos de 3 <input type="checkbox"/> entre 3 y 9 <input type="checkbox"/> más de 9 <input type="checkbox"/>

DIETA:	¿Definiría su dieta como equilibrada? SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Es rica en vegetales y frutas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Es rica en proteínas SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Es rica en azúcares: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	Es rica en grasas: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

DEPORTE (más de 45 minutos seguidos)	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
2 o menos días a la semana <input type="checkbox"/>	entre 2 y 4 <input type="checkbox"/> más de 5 <input type="checkbox"/>

Le importaría que volviéramos a contactar con usted para recabar más información	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Teléfono: _____	Nombre para contactar con usted: _____

ANEXO 3: MÉTODO
EXTRACCIÓN RNA.

Extracción de ARN con Trizol/cloroformo.

(A lo largo de todo el protocolo, trabajar en hielo el máximo tiempo posible)

1. Mantener los tubos que contienen las muestras de tejido en hielo durante su descongelación.

2. Rotular un tubo eppendorf/muestra de 2ml y añadirle 800 μ l de Trizol®

(SigmaAldrich, San Luis, MO) a temperatura ambiente. Dejar 5 minutos.

3. Añadir 1ml la pieza de tejido y dejar actuar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

4. Someter la muestra a sonicación (baño de ultrasonidos) para completar la

homogenización del tejido. Añadir 600 ml de agua al sonicador y realizar 3

ciclos de sonicación de 3 minutos cada uno, dejando 1 minuto de descanso entre ciclo y ciclo.

5. Añadir 160 μ l de cloroformo, agitar vigorosamente durante 15 segundos y dejar actuar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

6. Volver a agitar las muestras y centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos a 2°C.

7. Preparar un nuevo tubo eppendorf/muestra de 2ml, roturarlo y añadir 400 μ l de isopropanol.

8. Pasar el sobrenadante (fase superior transparente) al nuevo tubo que contiene isopropanol, evitando arrastrar la fase blanca proteica y desechar el tubo.
9. Mezclar bien por inversión del nuevo tubo y centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos a 2°C.
10. Tirar el sobrenadante volcando el tubo y arrastrarlo sobre un papel absorbente sin dar golpes bruscos para no levantar el pellet que alberga el ARN.
11. Resuspender el pellet en 800 µl de etanol al 70%.
12. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a 2°C.
13. Tirar el sobrenadante volcándolo sobre un papel absorbente, evitando dar golpes bruscos.
14. Dejar los tubos abiertos e inclinados boca abajo durante 30 minutos para evaporar el resto de etanol que haya podido quedar.
15. Resuspender el pellet en 60 µl de H₂O libre de RNAasas y tapar bien. Mantener en frío.
16. Conservar a -80 °C.

