

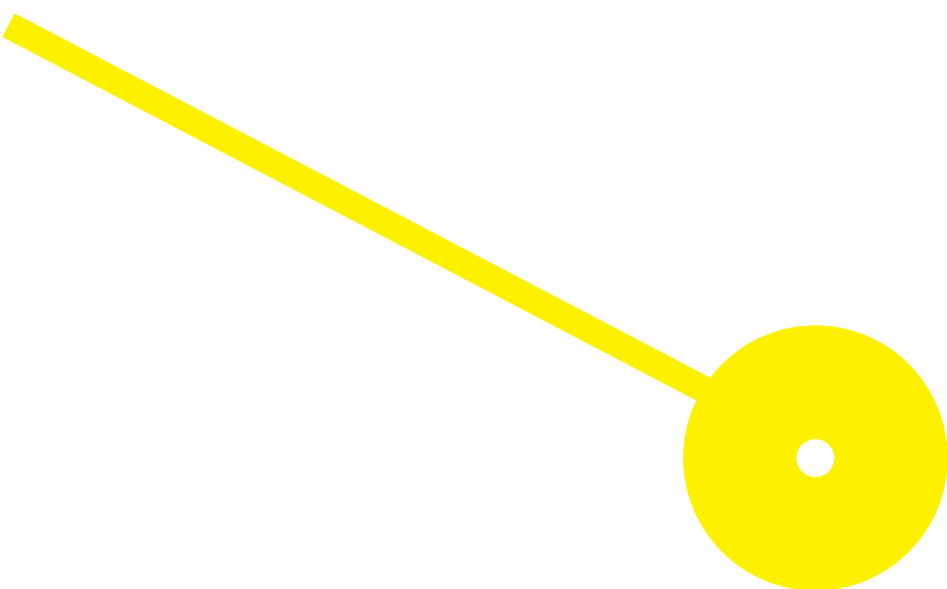
M

MESTRADO
BIOQUÍMICA EM SAÚDE

Biópsia líquida como teste não invasivo em cancros urológicos

Fábio Rúben Cabral Soares Monteiro

12/2019

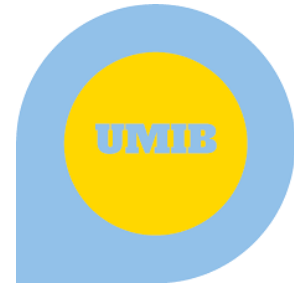




**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



UNIDADE DE INVESTIGAÇÃO EM ONCOBIOLOGIA
Centro Hospitalar do Porto



Biópsia líquida como teste não invasivo em cancros urológicos

Autor

Fábio Rúben Cabral Soares Monteiro

Orientadores

MD, PhD, António Araújo, UNIO | ICBAS

MD, PhD, Cristina Prudêncio, ESS | IPP

PhD, Ana Noga, UNIO | ICBAS

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo em Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos os que contribuíram para que esta dissertação fosse realizada. A todos vocês, muito obrigado.

Ao Professor Doutor António Araújo, agradeço profundamente a hipótese de realizar este projeto no grupo UNIO, bem como a confiança que me depositou.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, pela ajuda e disponibilidade na procura de tema e local para realizar a tese.

À Doutora Ana Nogal, muito obrigado por me teres acompanhado durante este projeto, sempre otimista e disponível para ajudar.

À Doutora Raquel Catarino, agradeço pelo apoio que me deu na parte mais clínica do trabalho, na recolha de amostras, e, principalmente, na análise estatística dos resultados.

À Doutora Mónica Gomes, por me acompanhar e orientar no início do projeto.

À Professora Doutora Mónica Vieira, por estar sempre disponível para esclarecer dúvidas e fazer correções antes do trabalho final.

Aos investigadores e funcionários do Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães, pela prontidão e simpatia que sempre apresentaram.

Ao pessoal do Serviço de Urologia da Unidade Local de Saúde de Matosinhos, pela ajuda na recolha, armazenamento e levantamento das amostras.

A todos os meus amigos, pelos momentos, conversas e desabafos, que me ajudaram a desanuviar.

Aos meus pais e irmã, por estarem sempre dispostos a ajudar, conversar e abstrair, e por me fazerem ver que o esforço é sempre recompensado.

Resumo

As neoplasias urológicas, nomeadamente o cancro da bexiga, são muito comuns em países ocidentais e a sua incidência tem vindo a aumentar. Em 2013, registaram-se 2,1 milhões de novos casos, e as mortes associadas aumentaram cerca de 1,6 vezes desde 1990. Apesar dos avanços recentes na terapêutica destes tumores, existe ainda a necessidade de ferramentas de diagnóstico precoce, assim como de testes não invasivos e de baixo custo para o seu rastreio e vigilância atempada e precisa, de forma a otimizar os resultados dos tratamentos.

Neste contexto, os marcadores moleculares agregam um grande potencial no suporte da decisão clínica. Embora se recorra ao PSA como marcador de diagnóstico e auxiliar de recidiva de cancro da próstata, este ainda possui algumas limitações na sua aplicabilidade clínica. No caso do cancro da bexiga, ainda é necessário um biomarcador de rotina, e, dada a sua elevada taxa de recorrência, o seguimento é realizado por cistoscopia, um exame caro e que exige muitos recursos, tornando-o o cancro mais caro para tratar por cada caso incidente. Deste modo, os ácidos nucleicos detetados em fluidos biológicos podem fornecer informação acerca do tumor e proporcionar uma fonte acessível de material tumoral. Vários estudos indicam que estes ácidos nucleicos advêm de processos de morte de células tumorais. Estudos recentes têm evidenciado o potencial da deteção de DNA circulante no sangue periférico de doentes oncológicos, mas a literatura acerca do seu potencial uso na urina de doentes com cancros urológicos é escassa. Enquanto que o sangue é naturalmente homeostático, a amostra de urina tende a refletir alterações no seu ambiente, e pode ser obtida através de procedimentos não invasivos.

O objetivo deste estudo consistiu na aplicação de um teste simples, que pudesse ser utilizado como ferramenta de diagnóstico complementar não invasiva. Para tal, estudaram-se 36 doentes com cancro da bexiga e 40 indivíduos-controlo. O DNA livre foi extraído de urina e plasma com recurso a um kit comercial, e quantificaram-se os seus níveis, através da amplificação do gene *hTERT*, pela metodologia de PCR em tempo real. Os resultados foram sujeitos à análise estatística apropriada.

Os resultados obtidos permitem observar um aumento da [ucfDNA] com o avançar do estadio tumoral, bem como uma concentração elevada de cfDNA no estadio T2. Apesar de não possuírem significância estatística, estes resultados são promissores, uma vez que poderá ser possível obter informação mais rápida, precisa e de modo mais inócuo do que a obtida pelos métodos atuais. Para validar estas descobertas, seria necessário ampliar a amostra, de modo a obter uma maior representação de cada um dos estadios da doença.

Palavras-chave: cancro da bexiga; diagnóstico precoce; urina; DNA circulante; não invasivo

Abstract

Urologic neoplasms, particularly bladder cancer, are very common in western countries, and their incidence has been rising. In 2013, 2.1 million new cases were registered, with an increase of 1.6-fold in the associated deaths since 1990. Despite the technological advancements on these tumors' therapeutics, there's still a need for early diagnosis tools, as well as non-invasive and low-cost tests, for a more precise and early screening and surveillance, as to optimize the treatment outcomes.

In this context, molecular markers aggregate a huge potential in supporting clinical decision. Even though PSA is used as a diagnostic and complementary relapse marker for prostate cancer, it still possesses some hindrances on its clinical applicability. As for bladder cancer, there is still a need for a routine biomarker, and, considering its recurrence rate, the follow-up is done by cystoscopy, an expensive and resource-wasting exam, making it the most expensive cancer to treat, per incident case. Thereby, nucleic acids detected in biological fluids can provide information about the tumor and act as an accessible source of tumor material. Several studies indicate that these nucleic acids originate from death processes of tumor cells. Recent studies have highlighted the potential of circulating DNA detection in peripheral blood of oncologic patients, but there's a lack of research about this potential in urologic patients' urine. While blood is homeostatic, urine samples tend to demonstrate changes in its composition, and they can be harvested by non-invasive procedures.

The objective of this study consisted on the application of a simple test, that could be used as a complementary non-invasive diagnostic tool. To this end, 36 patients with bladder cancer and 40 healthy individuals were studied. Free DNA was extracted from urine and plasma using a commercial kit, and its levels were quantified, through the amplification of the *hTERT* gene, by real-time PCR. The results were subjected to the appropriate statistical analysis.

Our results show an increase of [ucfDNA] with the development of tumor stage, as well as a high cfDNA concentration in T2 stage. Even though the results don't possess statistical significance, they are still promising, since they could be possibly be used to obtain faster and more precise information, in a more innocuous manner than the one provided by current methods. To validate these discoveries, it would be necessary to increase the studied sample, as to obtain a bigger representation of each of bladder cancer's stages.

Keywords: bladder cancer; early diagnosis; urine; circulating DNA; non-invasive

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1. Cancro da bexiga..... | 1 |
| 1.1.1. Subtipos de cancro da bexiga..... | 2 |
| i. Carcinoma urotelial da bexiga..... | 2 |
| ii. Outros subtipos de cancro da bexiga..... | 3 |
| 1.1.2. Classificação e estadiamento..... | 4 |
| 1.1.3. Diagnóstico..... | 7 |
| 1.1.4. Tratamento e recidiva..... | 11 |
| i. Tratamento..... | 11 |
| ii. Recidiva..... | 12 |
| 1.2. Biomarcadores..... | 13 |
| 1.2.1. Características e vantagens da urina no diagnóstico de cancro da bexiga..... | 14 |
| 1.2.2. Ácidos nucleicos livres circulantes..... | 15 |
| 1.3. Gene <i>hTERT</i> | 18 |
| 1.3.1. Telómeros..... | 18 |
| 2. Objetivos | 20 |
| 3. Métodos | 21 |
| 3.1. População-alvo..... | 21 |
| 3.2. Recolha e preparação das amostras..... | 21 |
| 3.2.1. Extração de cfDNA a partir de plasma..... | 21 |
| 3.2.2. Extração de ucfDNA a partir de urina..... | 22 |
| 3.3. Amplificação do DNA circulante..... | 23 |
| 3.4. Análise estatística dos resultados..... | 24 |
| 3.5. Recursos humanos e materiais utilizados..... | 25 |
| 4. Resultados | 26 |
| 4.1. Perfil demográfico e clínico da população controlo e doente..... | 26 |
| 4.2. Concentrações de DNA circulante no plasma..... | 27 |
| 4.3. Concentrações de DNA circulante na urina..... | 29 |
| 5. Discussão | 32 |
| 6. Conclusão | 35 |
| 7. Referências Bibliográficas | 36 |

Lista de abreviaturas

| | |
|---------------------|---|
| ASDRs | <i>Age-Standardized Death Rates</i> |
| ASIRs | <i>Age-Standardized Incidence Rates</i> |
| AUC | <i>Area Under Curve</i> |
| AURKA | <i>gene aurora kinase A</i> |
| BCG | <i>Bacillus Calmette-Guerin</i> |
| cfDNA | <i>cell-free DNA</i> |
| CIS | <i>Carcinoma in situ</i> |
| CTC | <i>Células Tumorais Circulantes</i> |
| exoDNA | <i>DNA exossomal</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FISH | <i>Fluorescence in situ hybridization</i> |
| <i>hTERT</i> | <i>gene human telomerase reverse transcriptase</i> |
| NIHGC | <i>Non-Invasive Papillary Urothelial Carcinoma (High-Grade)</i> |
| NILGC | <i>Non-Invasive Papillary Urothelial Carcinoma (Low-Grade)</i> |
| NSCLC | <i>Non-Small Cell Lung Cancer</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PSA | <i>Prostate-Specific Antigen</i> |
| PUNLMP | <i>Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential</i> |
| RIA | <i>Radioimmunoassay</i> |
| ROC | <i>Receiver-Operating Characteristics</i> |
| <i>UCA-1</i> | <i>urothelial carcinoma-associated gene</i> |
| RTU-V | <i>resseção transuretral da bexiga</i> |
| uDNA | <i>DNA urinário</i> |
| ucfDNA | <i>urinary cell-free DNA</i> |
| UCr | <i>Urinary Creatinine</i> |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela I – Classificação TNM de cancro da bexiga (Smolensky <i>et al.</i> , 2016) | 6 |
| Tabela II – Biomarcadores genéticos urinários para a deteção e vigilância de cancro da bexiga (Sapre, Anderson, Costello <i>et al.</i> , 2014) | 9 |
| Tabela III – Resposta imune ao BCG (Fuge, Vasdev, Allchorne <i>et al.</i> , 2015)..... | 11 |
| Tabela IV – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> e sonda usados na amplificação do gene <i>hTERT</i> (Sozzi <i>et al.</i> , 2003)..... | 23 |
| Tabela V – Componentes e respetivos volumes necessários para a preparação da mistura de reação na amplificação do gene <i>hTERT</i> (Catarino, 2008; Catarino <i>et al.</i> , 2012) | 24 |
| Tabela VI – Perfil térmico de PCR usado na amplificação do gene <i>hTERT</i> (Catarino, 2008; Catarino <i>et al.</i> , 2012) | 24 |
| Tabela VII – Perfil demográfico dos indivíduos doentes e indivíduos controlo..... | 26 |
| Tabela VIII – Perfil clínico da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga..... | 27 |
| Tabela IX – Concentrações de cfDNA da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga, estratificadas pelo estadio..... | 28 |
| Tabela X – Análise estatística das concentrações de cfDNA obtidas para os diferentes estadios..... | 28 |
| Tabela XI – Concentrações de ucfDNA da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga, estratificadas pelo estadio..... | 29 |
| Tabela XII – Análise estatística das concentrações de ucfDNA obtidas para os diferentes estadios | 30 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura I – Evolução das ASDRs e ASIRs em casos de cancro da bexiga, entre 1990 e 2013, em mulheres e homens. Adaptado de Dy <i>et al.</i> , 2017..... | 2 |
| Figura II – Imagens cistoscópicas de (a) carcinoma papilar e (b) carcinoma <i>in situ</i> , e respetiva histologia confirmatória (coloração com Hematoxilina e Eosina). Adaptado de Sanli <i>et al.</i> , 2017..... | 3 |
| Figura III – Subtipos histológicos de cancro da bexiga. Da esquerda para a direita, e de cima para baixo: Carcinoma de células escamosas da bexiga; Adenocarcinoma da bexiga com células <i>signet ring</i> ; Adenocarcinoma de células claras da bexiga; Carcinoma de pequenas células da bexiga. Adaptado de Mostofi, 1973 e Shanks & Iczkowski, 2009..... | 4 |
| Figura IV – Classificação, estadiamento e invasividade do cancro da bexiga. A classificação está de acordo com os critérios de 2016 da WHO/ISUP (<i>World Health Organization; International Society of Urological Pathology</i>). A nomenclatura do estadiamento segue o sistema TNM (<i>Tumour-Node-Metastasis</i>). Adaptado de Knowles & Hurst, 2015..... | 5 |
| Figura V – Classificação histológica de neoplasias urológicas papilares. (a) papiloma urotelial benigno; (b) PUNLMP; (c) NILGC; (d) NIHG. Adaptado de Miyamoto <i>et al.</i> , 2010..... | 7 |
| Figura VI – Imagens histológicas representativas e respetivos resultados FISH para os cromossomas 3, 7 e 17, e para o <i>locus</i> 9p21, provenientes de doentes com inflamação da bexiga (grupo controlo) e vários estadios tumorais de cancro da bexiga (pTa, pT1 e pT2). O sinal vermelho representa o cromossoma 7 ou o <i>locus</i> 9p21, e o sinal verde representa o cromossoma 3 ou 17. Adaptado de Ke <i>et al.</i> , 2014..... | 10 |
| Figura VII – Curva ROC da integridade de ucfDNA (<i>urinary cell-free DNA</i>). Adaptado de Casadio <i>et al.</i> , 2013.. | 15 |
| Figura VIII – Origens de ucfDNA. Adaptado de Lu & Li, 2017..... | 17 |
| Figura IX – Representação esquemática dos locais <i>cis</i> no promotor <i>hTERT</i> . A caixa cinzenta representa a sequência cromossómica, desde 3,5 kb a jusante e 150 bp a montante do local de início de transcrição (+1). As linhas horizontais indicam aproximadamente o locais de ligação dos respetivos fatores de transcrição. Linhas azuis: mutações <i>hotspot</i> promotoras (“-124” corresponde à mutação C228T; “-146 corresponde à mutação C250T); linhas verdes: ativadores da transcrição; linhas vermelhas: repressores; linhas roxas; reguladores com papel dual; linhas a tracejado: regulador ligado a local originado a partir de mutações <i>hotspot</i> . Adaptado de Ramlee <i>et al.</i> , 2016..... | 18 |
| Figura X – Representação gráfica da idade média, em anos, dos controlos saudáveis e dos doentes oncológicos. A barra preta horizontal representa a média de idades, em anos; a caixa azul é delimitada pelo valor mínimo e máximo; as projeções representam o desvio-padrão..... | 26 |
| Figura XI – Gráfico de barras que relaciona as concentrações de cfDNA, em amostras de plasma, com o estadio das amostras analisadas..... | 28 |
| Figura XII – Média da [cfDNA] para os controlos saudáveis e para os doentes oncológicos..... | 29 |

| | |
|--|----|
| Figura XIII – Gráfico de barras que relaciona as concentrações de ucfDNA, em amostras de urina, com o estadiio das amostras analisadas..... | 30 |
| Figura XIV – Média da [ucfDNA] para os controlos saudáveis e para os doentes oncológicos..... | 31 |

1. Introdução

Os cancros urológicos, incluindo o da bexiga, próstata e rim, afetam principalmente indivíduos idosos e homens (Dy, Gore, Forouzanfar, Naghavi, & Fitzmaurice, 2017), sofrendo influência variável por fatores de risco comportamentais modificáveis, metabólicos e ambientais. Apesar de não caracterizada a nível global, a influência biológica diferencial do género, hábitos tabágicos e obesidade afeta substancialmente a incidência e as consequências das malignidades urológicas (Dy *et al.*, 2017).

Em 2013, este conjunto de cancros representou 2,1 milhões dos novos casos mundiais de cancro, aumentando cerca de 2,5 vezes em relação a 1990. A taxa de mortalidade subiu 1,6 vezes, e 82,4% dos novos casos foram diagnosticados em indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos (Dy *et al.*, 2017).

Comparando países em desenvolvimento com países desenvolvidos, a incidência de cancros urológicos é aproximadamente 2 vezes maior nestes últimos. Tanto a taxa ASDR (*age-standardized death rate*), como a taxa ASIR (*age-standardized incidence rate*) são superiores nos países desenvolvidos, sendo a ASIR 3 a 5 vezes maior que a de países em desenvolvimento. No entanto, as taxas de mortalidade foram consistentemente superiores nestes últimos (cancro da bexiga, 0,75 vs 0,29; cancro do rim, 0,59 vs 0,38; cancro da próstata, 0,26 vs 0,19) (Dy *et al.*, 2017).

1.1. Cancro da bexiga

O cancro da bexiga é classificado como um dos 10 cancros mais incidentes a nível mundial. É um dos tumores urológicos malignos mais frequentes, com aproximadamente 420 000 novos casos anuais, entre homens e mulheres, sendo uma das principais causas de morte relacionadas com cancro (Ward & Bryan, 2017).

Os novos diagnósticos de cancro da bexiga aumentaram 1,5 vezes entre 1990 e 2013, havendo, em 2013, maiores ASIRs em homens de países desenvolvidos, quando comparados com mulheres e homens de países em desenvolvimento (Figura I). As mortes aumentaram 1,3 vezes entre 1990 e 2013, e as ASDRs mantiveram-se superiores em homens de países desenvolvidos, comparando com mulheres destes mesmos países e homens de países em desenvolvimento. Mulheres em países em desenvolvimento possuíam os valores de ASDR mais baixos (Figura I) (Dy *et al.*, 2017).

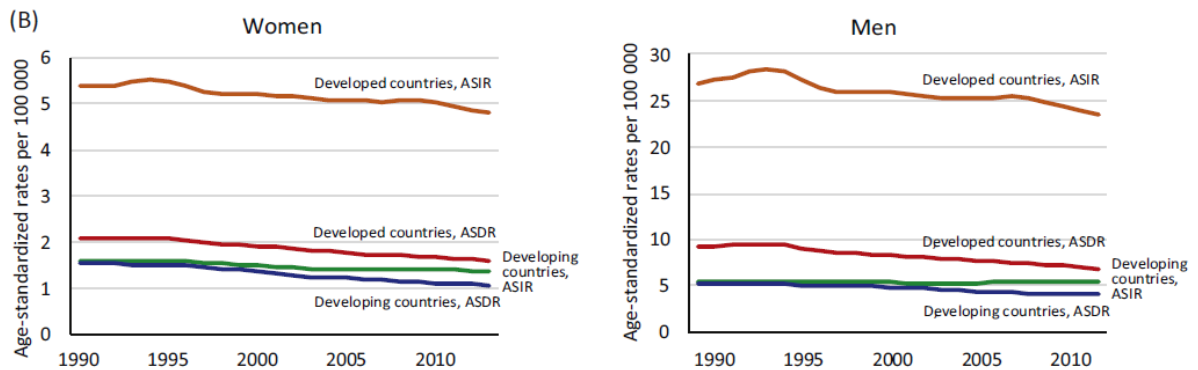


Figura I – Evolução das ASDRs e ASIRs em casos de cancro da bexiga, entre 1990 e 2013, em mulheres e homens. Adaptado de Dy *et al.*, 2017.

Existem alguns fatores que conferem um maior risco de desenvolvimento de cancro da bexiga. O tabaco está associado a 90% dos casos de cancro da bexiga, possuindo um efeito mais notório em países desenvolvidos (Dy *et al.*, 2017). Por sua vez, a síndrome metabólica (obesidade, diabetes, hipertensão, entre outros) tem sido associada à etiologia desta patologia (Uzunlulu, Telci Caklili, & Oguz, 2016). A infeção pelo parasita *Schistosoma haematobium* também provoca cancro da bexiga, especialmente em países em desenvolvimento (Mostafa, Sheweita, & O'Connor, 1999).

1.1.1. Subtipos de cancro da bexiga

O cancro da bexiga pode ser dividido em 4 principais tipos histológicos: carcinoma urotelial (invasivo ou não-invasivo), carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de pequenas células. Todos estes subtipos se desenvolvem a partir do urotélio e apresentam características morfológicas específicas. Os cancros invasivos apresentam normalmente características mistas, incluindo mais do que um fenótipo (Moschini *et al.*, 2017). Considerando a sua prevalência, é de evidenciar o carcinoma urotelial da bexiga.

i. Carcinoma urotelial da bexiga

Estes tumores são também conhecidos como carcinomas de células transicionais, e representam mais de 90% dos cancros invasivos da bexiga (Kumar, Abbas & Aster, 2015), podendo exibir tanto um padrão de crescimento papilar como sólido (Sanli *et al.*, 2017).

Os carcinomas papilares (Figura IIa) raramente invadem a camada muscular da bexiga, e normalmente não metastizam, mas são altamente suscetíveis a recidiva, o que requer monitorização constante e cara, com intervenções cirúrgicas repetidas (McConkey, Choi, Ochoa, & Dinney, 2016).

Contudo, existe a possibilidade de um tumor papilar se tornar invasivo, especialmente se for de alto grau (Kumar *et al.*, 2015).

Por outro lado, os cancros não-papilares progridem rapidamente, tornando-se metastáticos (McConkey *et al.*, 2016). Os órgãos mais comuns para o aparecimento de metástases são o fígado, pulmão, cérebro e osso, embora ainda não se conheçam os mecanismos subjacentes (McConkey *et al.*, 2016).

O carcinoma *in situ* (CIS) merece especial atenção na discussão sobre a classificação dos carcinomas de células transitórias. O CIS é definido como um carcinoma plano (Figura IIb) pouco diferenciado, confinado à mucosa (isto é, não-invasivo). Contudo, possui potencial de progredir para doença invasiva, tornando-o um cancro agressivo (Sanli *et al.*, 2017).

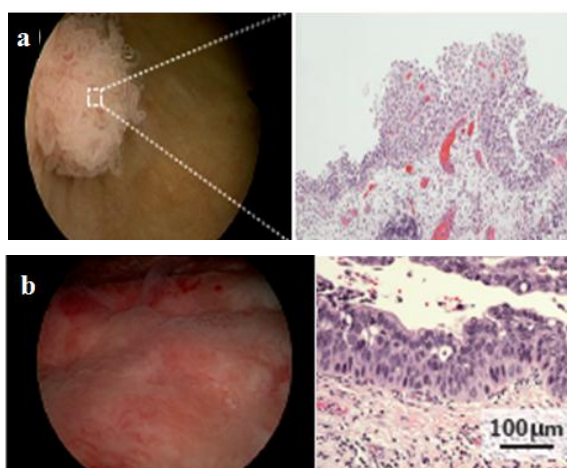


Figura II – Imagens cistoscópicas de (a) carcinoma papilar e (b) carcinoma *in situ*, e respetiva histologia confirmatória (coloração com Hematoxilina e Eosina). Adaptado de Sanli *et al.*, 2017.

ii. Outros subtipos de cancro da bexiga

O carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma de pequenas células da bexiga representam, respetivamente, 3%, 2% e 0,5% de todos os casos de cancro da bexiga, sendo quase sempre invasivos (Moschini *et al.*, 2017).

O carcinoma de células escamosas (Figura III) apresenta um fenótipo histológico puramente de células escamosas, algumas vezes acompanhado por metaplasia queratinizante escamosa no epitélio simples adjacente (Kumar *et al.*, 2015).

Os adenocarcinomas dividem-se em adenocarcinomas primários e secundários. Os primeiros derivam do urotélio e apresentam um fenótipo puramente glandular. Os adenocarcinomas secundários apresentam um padrão de crescimento variável, com células do cólon, próstata, endométrio, cérvix, mama, pulmão, células claras e *signet ring* (Figura III) (Dadhania, Czerniak, & Guo, 2015).

Por último, o carcinoma de pequenas células (Figura III) da bexiga é uma neoplasia neuroendócrina maligna, histologicamente mimética da sua contraparte pulmonar (Moschini *et al.*, 2017). Este tipo de cancro aparece tipicamente como uma grande massa sólida de células pequenas e uniformes, com núcleos picnóticos redondos ou ovais, cuja cromatina está dispersa (Moschini *et al.*, 2017), apesar de que pelo menos metade dos casos têm mistura de componentes de não pequenas células, como elementos uroteliais ou glandulares (Shanks & Iczkowski, 2009).

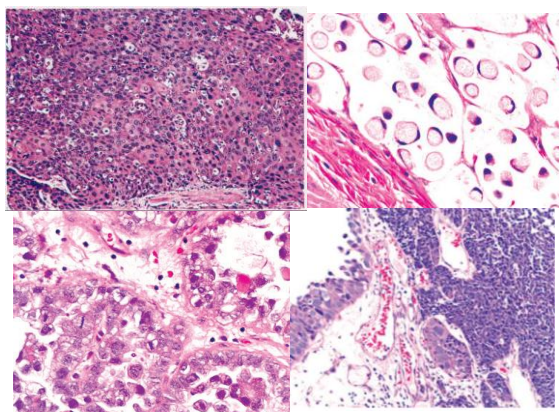


Figura III – Subtipos histológicos de cancro da bexiga. Da esquerda para a direita, e de cima para baixo: Carcinoma de células escamosas da bexiga; Adenocarcinoma da bexiga com células *signet ring*; Adenocarcinoma de células claras da bexiga; Carcinoma de pequenas células da bexiga. Adaptado de Mostofi, 1973 e Shanks & Iczkowski, 2009.

1.1.2. Classificação e estadiamento

Após o diagnóstico do subtipo de cancro da bexiga, o elemento mais importante na sua avaliação patológica é reconhecer a presença e a extensão da invasão, processo denominado de estadiamento. A figura IV apresenta a classificação, estadiamento e invasividade do cancro da bexiga.

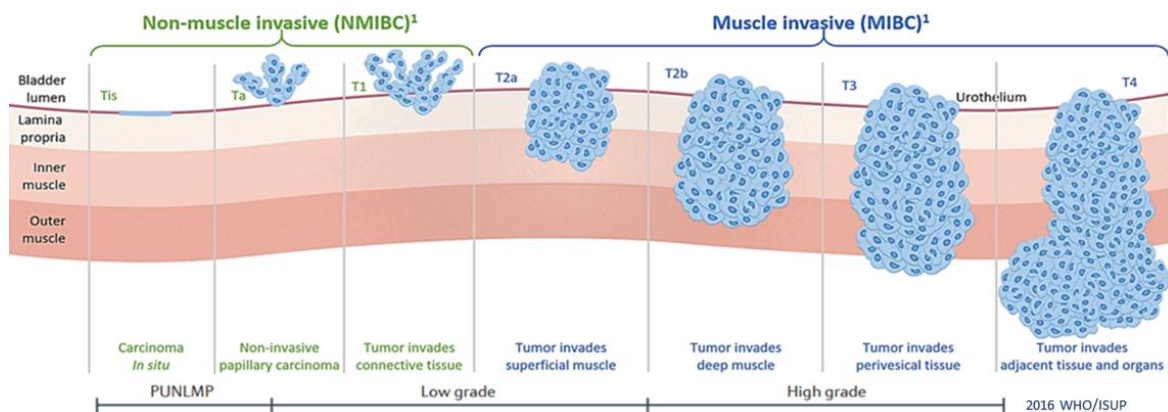


Figura IV – Classificação, estadiamento e invasividade do cancro da bexiga. A classificação está de acordo com os critérios de 2016 da WHO/ISUP (*World Health Organization; International Society of Urological Pathology*). A nomenclatura do estadiamento segue o sistema TNM (*Tumour–Node–Metastasis*). Adaptado de Knowles & Hurst, 2015.

Um bom sistema de classificação deve ser robusto, reproduzível e fácil de compreender e aplicar (Comperat et al., 2018). De modo a descrever de um modo coerente o avanço tumoral do cancro da bexiga, foi criado um sistema, denominado TNM (*Tumour–Node–Metastasis*) (Smolensky, Rathore, & Cekanova, 2016), baseado em 3 pontos-chave:

- **T** – Descreve quanto é que o tumor primário cresceu pela parede da bexiga, e se este cresceu para tecidos adjacentes.
- **N** – Indica se o tumor se espalhou para nódulos linfáticos proximais.
- **M** – Aponta a presença de metastização do tumor para órgãos ou nódulos linfáticos afastados do tumor primário.

Estes três grupos possuem ainda subdivisões cardinais, desde o grau 0 (carcinoma *in situ*) até 4. À medida que o grau aumenta, maior a expansão e avanço tumoral. Dentro de cada divisão numérica, ocorre também subdivisão com letras, onde a letra “a” indica um estadio mais precoce que a letra “b” de um mesmo grau. Para uma melhor compreensão desta classificação, a tabela I apresenta uma breve descrição patológica do sistema TNM.

Tabela I – Classificação TNM de cancro da bexiga (Smolensky *et al.*, 2016)

| T – Tumor Primário | |
|--|---|
| TX | Não é possível avaliar tumor primário |
| T0 | Sem evidência do tumor primário |
| Ta | Carcinoma papilar não-invasivo |
| Tis | Carcinoma <i>in situ</i> (sólido) |
| T1 | Tumor invade tecido conjuntivo subepitelial |
| Tumor invade músculo | |
| T2 | T2a Tumor invade músculo (camada interna) |
| | T2b Tumor invade músculo (camada externa) |
| Tumor invade tecido perivesical | |
| T3 | T3a Invasão microscópica |
| | T3b Invasão macroscópica (massa extravesical) |
| Tumor invade: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou abdominal | |
| T4 | T4a Tumor invade: próstata, útero ou vagina |
| | T4b Tumor invade: parede pélvica ou abdominal |
| N – Nódulos Linfáticos | |
| NX | Não é possível avaliar nódulos linfáticos regionais |
| N0 | Sem metástase nos nódulos linfáticos proximais |
| N1 | Metástase num nódulo linfático proximal |
| N2 | Metástases múltiplas nos nódulos linfáticos proximais |
| N3 | Metástase linfática nos nódulos linfáticos ilíacos |
| M – Metástases | |
| MX | Não é possível avaliar metástases |
| M0 | Sem metástases |
| M1 | Presença de metástases |

As neoplasias não-invasivas da bexiga podem ser classificadas como: (i) neoplasias uroteliais papilares de baixo potencial maligno (PUNLMP, *Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential*); (ii) carcinomas uroteliais papilares não-invasivos de baixo grau (NILGC, *Non-Invasive Papillary Urothelial Carcinoma (Low-Grade)*); (iii) carcinomas uroteliais papilares não-invasivos de

elevado grau (NIHGC – *Non-Invasive Papillary Urothelial Carcinoma (High-Grade)*); e (iv) papiloma (Figura V) (Kumar *et al.*, 2015). Relativamente aos tumores invasivos, subdividem-se de acordo com a profundidade da invasão.

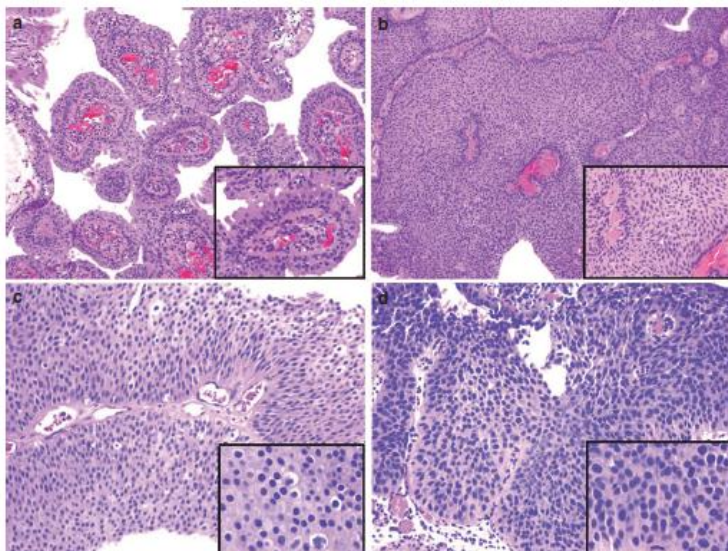


Figura V – Classificação histológica de neoplasias urológicas papilares. (a) papiloma urotelial benigno; (b) PUNLMP; (c) NILGC; (d) NIHGC. Adaptado de Miyamoto *et al.*, 2010

1.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico precoce tem um grande impacto no aumento do tempo de sobrevivência livre de doença, e na redução da mortalidade em doentes com diferentes tipos de tumores. Considerando o cancro da bexiga, um diagnóstico precoce aumenta a probabilidade de descobrir um tumor não invasivo, e a terapia possui maior hipótese de ser bem-sucedida (Casadio *et al.*, 2013). Aproximadamente 75% dos novos diagnósticos são de tumor não invasivo, e 25% têm doença músculo-invasiva ou metastática (Sanli *et al.*, 2017). No entanto, ainda não existem métodos diagnósticos inócuos para o bem-estar físico dos doentes durante o processo de deteção de cancro.

A deteção e diagnóstico de cancro da bexiga recorrem à cistoscopia e citologia urinária. A cistoscopia consiste num exame endoscópico das vias urinárias, que possibilita a visualização da mucosa vesical. Este exame é geralmente realizado com anestesia local, para diminuir o desconforto. O método de cistoscopia mais usado utiliza luz branca para a deteção de massas tumorais, mas por vezes não consegue detetar pequenos tumores papilares ou carcinomas *in situ* (Ryan Mark, Gelpi-Hammerschmidt, Trabulsi, & Gomella, 2012).

A citologia urinária é um método não invasivo, barato, fácil e simples de diagnóstico de cancro da bexiga (M. L. Zhang, Rosenthal, & VandenBussche, 2016). Enquanto que um resultado positivo para a

presença de células cancerígenas pode ser usado como diagnóstico, um resultado negativo nem sempre indica ausência de cancro (Smolensky *et al.*, 2016). É altamente específica (0,83–0,997), mas possui baixa sensibilidade (0,20–0,53) (Brems–Eskildsen *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2014), especialmente para tumores de baixo grau, ocorrendo, por vezes, casos em que a citologia é considerada atípica (Brems–Eskildsen *et al.*, 2010; Springer *et al.*, 2018). Além disso, como possui baixa sensibilidade na detecção de recorrência, a citologia urinária não é aplicada neste processo, recorrendo-se à cistoscopia (Springer *et al.*, 2018).

O exame de urina permite a detecção da presença de hematúria, que pode advir de situações benignas, como infecções, mas também pode ser um primeiro sinal de cancro da bexiga; devido a este fato, é um teste com baixo poder de diagnóstico diferencial (Sultana, Goodman, Byrne, & Baxby, 1996). Uma vez que, no caso de doentes do sexo feminino, a presença de hematúria é muitas vezes associada a infecção urinária (tanto pelas próprias doentes, como pelos profissionais de saúde), ao passo que em homens é imediatamente associada a neoplasia urológica, o cancro da bexiga é diagnosticado em mulheres já num estadio mais avançado do que em homens (D. S. Han, Zhou, Seigne, Lynch, & Schroeck, 2018).

O cancro da bexiga pode também ser detetado através de outros meios auxiliares de diagnóstico, nomeadamente a imagiologia. Nesta, utilizam-se raios-X (como tomografia computadorizada, ecografia, ressonância magnética e Medicina Nuclear, com recurso a substâncias radioativas), que permitem averiguar se ocorreu invasão de estruturas adjacentes à bexiga, como nódulos linfáticos proximais, ou até órgãos distantes, como o osso (Sultana *et al.*, 1996). Tem como pontos negativos o uso de radiação, prejudicial à saúde, e a ineficiência na detecção de doença residual mínima (X. Han, Wang, & Sun, 2017). A tomografia computadorizada usa raios-X para criar imagens 3D detalhadas do corpo, e a detecção do tumor depende do seu tamanho e morfologia. Apesar de possuir sensibilidade de 85% e especificidade de 94%, possui uma frequência elevada de falsos negativos (em particular para lesões planas e CIS), além de que sofre interferências por parte de biópsias prévias, inflamação e quimioterapia sistémica (Hafeez & Huddart, 2013).

A ressecção transuretral da bexiga (RTU-V) permite a realização de biópsias de lesões suspeitas e a ressecção de lesões neoforativas, que são estudadas histologicamente, para avaliação da presença de tecido tumoral. Pode também indicar se ocorreu invasão do tecido muscular adjacente (Sultana *et al.*, 1996). No entanto, não consegue detetar com precisão as alterações dinâmicas que ocorrem no tumor, devido à sua heterogeneidade (X. Han *et al.*, 2017).

De modo a diminuir o desconforto a que os doentes são sujeitos no diagnóstico de cancro da bexiga, têm sido reunidos esforços para desenvolver novas metodologias, menos invasivas, mais sensíveis e rápidas para a deteção deste tipo de tumores. A tabela II explicita alguns destes testes, que recorrem a biomarcadores.

Tabela II – Biomarcadores genéticos urinários para a deteção e vigilância de cancro da bexiga (Sapre, Anderson, Costello, Hovens, & Corcoran, 2014)

| Biomarcadores estabelecidos/comerciais | FISH (<i>UroVysion</i>) Cxbladder (uRNA-2) |
|--|---|
| | FISH (<i>Aurora kinase A</i>) |
| Biomarcadores usados em investigação | Deteção de microssatélites/perda de heterozigotia Metilação de DNA miRNA mRNA (ex: UCA-1 – <i>urothelial carcinoma-associated gene</i>) |

O teste *UroVysion*, que deteta alterações cromossómicas frequentemente encontradas em cancro da bexiga (Sapre et al., 2014), foi inicialmente aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para a vigilância de recorrência. Posteriormente foi estendido para a deteção de cancro da bexiga em doentes com hematuria (Springer et al., 2018), como complemento à citologia.

Através da tecnologia FISH (*Fluorescence in situ hybridization*), recorre a 2 sondas diferentes, detetando tanto a aneuploidia dos cromossomas 3, 7 e 17, como a perda de genes supressores tumorais (Sapre et al., 2014). Além disso, também analisa características da morfologia celular (Figura VI) (Ke, Lai, Ma, Lil, & Huang, 2014). Um resultado positivo para cancro da bexiga é usualmente definido como:

- Presença de mais de 5 células uroteliais com ganho em mais de 2 cromossomas;
- Presença de 10 ou mais células com ganho de um único cromossoma;
- Presença de 12 ou mais células com perda homozigótica do *locus* 9p21.

Contudo, a sensibilidade deste teste varia entre 69% e 85%, e a especificidade entre 78% e 92% (Sapre et al., 2014).

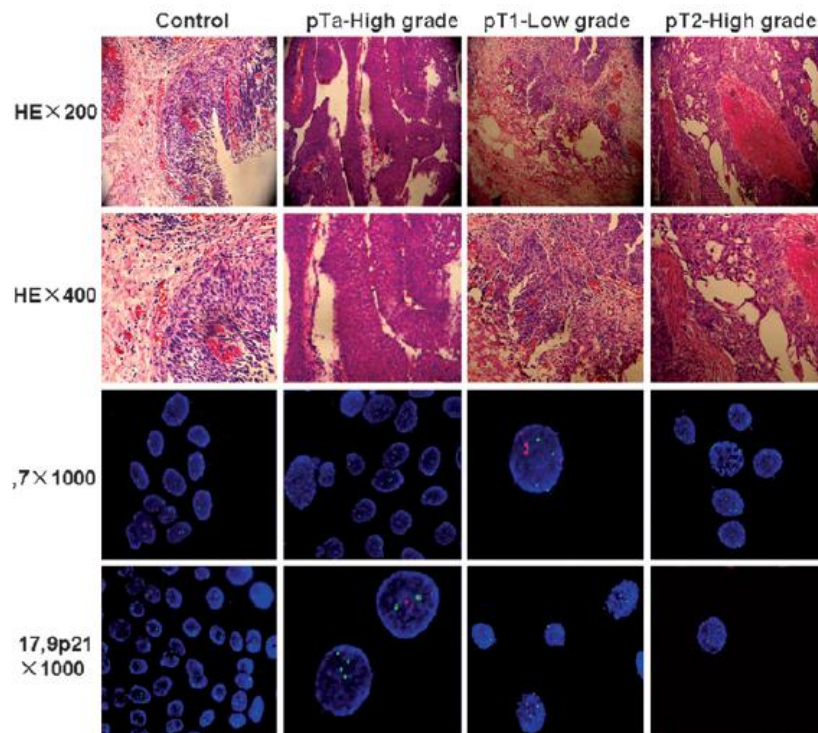


Figura VI – Imagens histológicas representativas e respetivos resultados FISH para os cromossomas 3, 7 e 17, e para o *locus* 9p21, provenientes de doentes com inflamação da bexiga (grupo controlo) e vários estadios tumorais de cancro da bexiga (pTa, pT1 e pT2). O sinal vermelho representa o cromossoma 7 ou o *locus* 9p21, e o sinal verde representa o cromossoma 3 ou 17. Adaptado de Ke *et al.*, 2014.

Um gene normalmente avaliado por UroVysion é o gene *AURKA* (*aurora kinase A*), muito importante na regulação da mitose. Com este método, Park e colaboradores (Park *et al.*, 2008) examinaram a amplificação do gene *AURKA* em células exfoliadas da urina. Os resultados obtidos permitiram a distinção entre urinas de doentes e de controlos saudáveis, com uma especificidade de 96,6% e sensibilidade de 87%, possuindo uma AUC (*Area Under Curve*) da curva ROC (*Receiver-Operating Characteristics*) de 0,94. Além disso, o grau de amplificação do gene estava também associado com maior grau de doença (Park *et al.*, 2008).

Apesar das vantagens que apresenta, ocorre ainda um número elevado de falsos negativos, uma vez que podem ocorrer alterações cromossómicas não quantificáveis por este método, e também um grande número de falsos positivos, gerados a partir de tetraploidia. Esta pode refletir apenas uma situação normal de divisão celular, ou uma resposta proliferativa do epitélio da bexiga a um estímulo inflamatório, e não a um processo cancerígeno (Lavery, Zaharieva, McFaddin, Heerema, & Pohar, 2017).

Por este motivo, este teste ainda não é usado no diagnóstico clínico de rotina.

1.1.4. Tratamento e recidiva

i. Tratamento

O tratamento a realizar depende de vários fatores, em particular do estadiamento tumoral. A primeira abordagem inclui RTU-V, com a ressecção da lesão visualizada na cistoscopia e estudo histológico, para diagnóstico definitivo e estadiamento. Esta intervenção tem como objetivo reduzir o risco de recidiva e de progressão tumoral, mantendo o funcionamento correto da bexiga (Pietzak *et al.*, 2019). A maioria dos tumores diagnosticados são não músculo-invasivos, isto é, não invadem a camada muscular da bexiga, e os doentes (cerca de 30% progridem para cancro músculo-invasivo) são frequentemente submetidos a uma segunda RTU-V, dependendo do estadiamento tumoral (Pietzak *et al.*, 2019; Solsona *et al.*, 2010).

Para impedir a recidiva, realiza-se um seguimento apertado destes doentes, aliado a terapia, como é o caso da terapia intravesical, aplicada após RTU-V para cancros não invasivos ou minimamente invasivos. Esta instilação inicial não só destrói células cancerígenas residuais no local da ressecção, como células tumorais circulantes originadas pós-RTU-V (Babjuk *et al.*, 2013).

A terapia intravesical pode ser dividida em 2 categorias:

- **Imunoterapia intravesical** – terapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), principal método para tratar cancro da bexiga não músculo-invasivo. O tratamento geralmente começa algumas semanas depois de RTU-V, e é administrado uma vez por semana, durante 6 semanas. No entanto, cerca de 30–40% dos doentes não responde a esta terapia (Zlotta, Fleshner, & Jewett, 2009). A tabela III resume a resposta imune do organismo do doente ao BCG.

Tabela III – Resposta imune ao BCG (Fuge, Vasdev, Allchorne, & Green, 2015)

| Atividade de BCG | Mediação |
|---|---|
| 1. Infecção do urotélio e/ou das células tumorais da bexiga | Fibronectina |
| 2. Indução de resposta imune | Linfócitos Th, células dendríticas, macrófagos; MHC-I; IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α e IFN- γ |
| 3. Indução de efeitos antitumorais | Linfócitos Th1, via linfócitos T CD4+ e CD8+, e Th2, via células NK Recrutamento de neutrófilos, via IL-17 |

- **Quimioterapia intravesical** – nos casos em que o estadiotumoral seja T2–T4a, sem migração linfática ou metástases, o protocolo utilizado recorre ao uso de quimioterápicos, como MVAC (Metotrexato, Vinblastina, Doxorubicina, Cisplatina), ou outros fármacos baseados em cisplatina (Milowsky *et al.*, 2016; Soubra *et al.*, 2018). Em situações em que o doente não seja elegível para este tratamento (insuficiência renal ou idade, por exemplo), é utilizada a combinação de Gemcitabina e Carboplatina (Peyton *et al.*, 2018). Este procedimento é geralmente realizado antes de cistectomia radical, com o objetivo de eliminar micrometástases que possam existir. Apesar de haver um aumento no tempo de sobrevivência do doente e no tempo de sobrevivência livre de progressão (Kim, Lee, Jung, Hah, & Cho, 2019), este tratamento só é aplicado em 30–57% dos doentes, devido ao benefício marginal, comorbidades, elevada toxicidade e ao fato de levar a atrasos na cirurgia, particularmente em doentes que não respondam a esta terapia (Alfred Witjes *et al.*, 2017; Audenet *et al.*, 2019; Carles *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2019). Além disso, a quimioterapia pode piorar a resposta à terapia, devido às diferenças entre a interpretação dos estadios clínicos e patológicos, o que leva a sobretratamento (Kim *et al.*, 2019).

Após a administração de quimioterapia em tumores músculo-invasivos, o tratamento pode também incluir cistectomia radical, com remoção da totalidade da bexiga. A cirurgia inclui também a remoção de gânglios linfáticos pélvicos. No caso de homens, também se pode remover a vesícula seminal e a próstata (Babjuk *et al.*, 2013). Em mulheres, também é normal remover trompas de Falópio, útero, cérvix e uma pequena porção da vagina (Smith *et al.*, 2017). Apesar dos ovários serem removidos em muitos casos, há um risco mínimo (0,11%) de desenvolvimento de neoplasia neste órgão. Este fato levou a que fosse sugerida a sua preservação, devido aos potenciais benefícios para a saúde da mulher (Abboud *et al.*, 2019). É importante referir que o sexo feminino é um fator de risco independente para SSI (*surgical site infections*), a seguir a cistectomia radical, havendo maior probabilidade de desenvolver outras complicações, incluindo a abertura da sutura, choque séptico, e necessidade de realizar outra cirurgia ($p < 0,05$) (Abdi *et al.*, 2018).

A radioterapia é outro procedimento disponível, em especial, em casos em que o doente não pode ser sujeito a cirurgia (S. Zhang, Yu, Zhang, Qu, & Li, 2015).

ii. Recidiva

Como já referido, o tratamento primário para cancro da bexiga não músculo-invasivo é RTU–V, com ou sem quimioterapia intravesical ou imunoterapia. Após RTU–V, a instilação intravesical de mitomicina C reduz a probabilidade de ocorrer recidiva, variando entre 4% e 8,1% a nível uretral (Pichler *et al.*, 2017; Stamm *et al.*, 2018). A maioria das recidivas desenvolve-se durante os primeiros 2 anos

pós-cirurgia (Pichler *et al.*, 2017), e existe relação direta entre grau e estadió do tumor e maior taxa de recorrência (Su *et al.*, 2014). Como resultado, os doentes necessitam de monitorização frequente e duradoura após RTU-V, aumentando ainda mais os custos deste tipo de cancro.

O seguimento de cancro da bexiga baseia-se primariamente na cistoscopia, combinada com a citologia urinária (Su *et al.*, 2014), num intervalo de 3 a 6 meses, durante os primeiros 2 anos pós-diagnóstico, 6-12 meses nos 2 anos seguintes, e de seguida anualmente, até se detetar novo tumor (Gupta, VandenBussche, & Bivalacqua, 2018). Os exames cistoscópicos, além de invasivos, desagradáveis, morosos e caros, podem ter efeitos secundários significativos, como infeções e traumatismo na uretra (Brems-Eskildsen *et al.*, 2010).

Existem alguns dados conflituosos sobre a associação entre várias características patológicas e recidiva no urotélio remanescente após resseção, nomeadamente o avançado estado patológico do tumor, CIS, multifocalidade tumoral e infiltração da parede vaginal anterior em mulheres, que parecem estar associados a maior risco de recidiva uretral (Pichler *et al.*, 2017).

Após cistectomia radical, se o doente não apresentar complicações, um menor tempo de estadia no hospital não está associado a maior probabilidade de recidiva (Lorentz, Gilbert, Alemozaffar, Patil, & Filson, 2018).

No entanto, apesar da vigilância de rotina, cerca de 44,7% das recidivas uretrais (Pichler *et al.*, 2017) são detetadas após desenvolvimento de sintomas clínicos, tendo sido associadas a um estadió tumoral avançado, pior prognóstico, e risco aumentado de morte por cancro, comparando com doentes assintomáticos (Pichler *et al.*, 2017).

Devido aos custos e dificuldades associados ao diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos tumores da bexiga, têm sido feitos esforços para descobrir novos biomarcadores, mais precisos, baratos e menos invasivos.

1.2. Biomarcadores

Os biomarcadores são características objetivamente medidas e avaliadas, atuando como indicadores de processos fisiológicos, patogénicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (Strimbu & Tavel, 2010).

Têm sido identificados e propostos novos biomarcadores sanguíneos e de tecido para a vigilância do aparecimento ou não de recidiva tumoral na bexiga. Um dos biomarcadores imunohistoquímicos candidatos é a p53. Foi descoberto que a proporção de amostras de cancro da bexiga com expressão alterada de p53 aumenta com o avanço do grau tumoral (Xylinas *et al.*, 2014).

A nível de biomarcadores sanguíneos, há um maior investimento na sua descoberta, uma vez que são minimamente invasivos e ultrapassam a barreira da heterogeneidade tumoral (Xylinas *et al.*, 2014). A presença de CTC (Células Tumorais Circulantes) é um destes biomarcadores, e estas são detetáveis em todos os estadios tumorais de doenças metastáticas e não metastáticas, havendo associação com a recidiva, prognóstico e mortalidade específica de cancro (Nagata, Muto, & Horie, 2016; Xylinas *et al.*, 2014).

Todavia, os estudos realizados com estes biomarcadores são controversos, e, por esta razão, estas biomoléculas ainda não são usadas na rotina clínica (Nagata, Muto, & Horie, 2016; Xylinas *et al.*, 2014).

1.2.1. Caraterísticas e vantagens da urina no diagnóstico de cancro da bexiga

Com o objetivo de manter a homeostasia sanguínea, qualquer alteração que é introduzida no sangue, tanto interna, como externamente, é eliminada pelo fígado, rim e/ou outros órgãos, através de uma panóplia de mecanismos (Gao, 2013).

Em contraste, como filtrado do sangue, a urina é o local para onde os resíduos do sangue são dirigidos, e, deste modo, tolera alterações na sua composição de um modo mais alargado, não tendo uma composição estável (Gao, 2013). Assim, devido à ausência de homeostasia urinária, estas características são possivelmente mais facilmente detetáveis na urina do que no sangue (Gao, 2013).

Atualmente, a urina é utilizada para exames complementares ao diagnóstico de cancro da bexiga. Um deles é a citologia urinária, um dos melhores métodos disponíveis. Para aumentar o seu poder diagnóstico, são realizados outros testes em conjunto, de modo a melhorar a sua sensibilidade e especificidade.

No que concerne a automação na citologia urinária, surgiram novos métodos para melhorar a sensibilidade e especificidade, especialmente para a deteção de lesões cancerígenas de baixo grau. A investigação atual neste tópico foca-se principalmente em 2 sistemas: totalmente automatizados ou semiautomáticos. O primeiro tipo de sistema inclui a citometria de fluxo e sistemas microscópicos fotométricos. O segundo tipo de instrumentos inclui citometria de imagem de televisão e análise quantitativa de imagem de fluorescência (Magiorkinis & Diamantis, 2015). Para facilitar a deteção de células uroteliais atípicas, desenvolveram-se uma série de testes para auxílio do diagnóstico, como métodos baseados na imunohistoquímica, que detetam CK20, Ki67, *hTERT*, entre outros (Magiorkinis & Diamantis, 2015).

No entanto, deve ser notado que estes testes apenas complementam o diagnóstico citológico da urina. Mais ainda, deve ser realçado que a deteção de células malignas na urina nem sempre está relacionada com carcinoma urotelial, uma vez que, através da citologia urinária, podem-se detetar

tumores que ocorram próximo ou mesmo na bexiga, como o da próstata, gastrointestinal ou ginecológico (Magiorkinis & Diamantis, 2015).

Apesar de vantajosa, a ausência de homeostasia pode dificultar a pesquisa de biomarcadores urinários, já que as alterações na urina são muito complexas para classificar os fatores associados a uma condição fisiopatológica particular, especialmente em amostras humanas (Gao, 2013). Mesmo assim, como a recolha de amostras de urina não é invasiva, e como existem poucos e pequenos problemas éticos e técnicos associados ao procedimento, a urina é das amostras biológicas mais facilmente acessíveis de doentes ou de indivíduos saudáveis (Gao, 2013), possuindo biomoléculas diagnósticas promissoras, como o DNA livre circulante.

1.2.2. Ácidos nucleicos livres circulantes

A presença de ácidos nucleicos extracelulares circulantes (*cell-free* DNA, cfDNA) na corrente sanguínea foi descrita pela primeira vez por Mandel e Métails, em 1948 (Catarino, 2008). Estes ácidos nucleicos podem ser provenientes tanto de tumores como de células saudáveis (Brisuda *et al.*, 2016), e, apesar de alguma degradação, conseguem ser recuperados do plasma de doentes, sendo depois usados como fonte alternativa de DNA tumoral (Gautschi *et al.*, 2004).

Recorrendo às biópsias líquidas, é possível ultrapassar tanto o problema da heterogeneidade tumoral, como a obtenção repetitiva de biópsias sólidas de tumores (X. Han *et al.*, 2017). A nível da deteção de cfDNA, esta pode ser realizada em tempo real e durante a duração da terapia, o que permite a monitorização dinâmica das alterações moleculares do tumor (Diaz & Bardelli, 2014). Além disso, é também não-invasiva, inócua, altamente específica e sensível (Figura VII) (Casadio *et al.*, 2013; X. Han *et al.*, 2017).

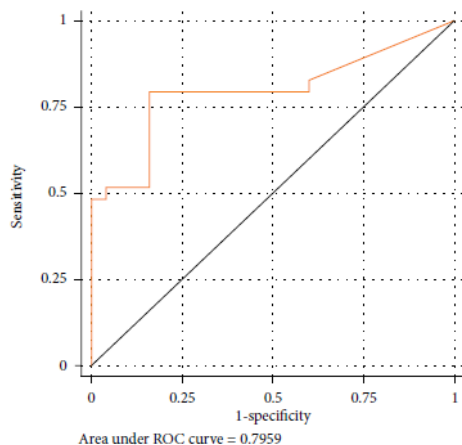


Figura VII – Curva ROC da integridade de ucfDNA (*urinary cell-free DNA*). Adaptado de Casadio *et al.*, 2013.

A biogénese de cfDNA começa nos processos de morte celular a que as células são sujeitas. No caso das células normais, estas sofrem apoptose, processo de morte celular programada e controlada, o que origina pequenos fragmentos de DNA uniformes (Chang *et al.*, 2007). Em relação às células tumorais (principalmente de tumores sólidos), ocorre necrose, onde há digestão aleatória do DNA genómico pelas nucleases, resultando em fragmentos de DNA com diferentes comprimentos (Chang *et al.*, 2007).

Vários estudos detetaram níveis aumentados de cfDNA em doentes oncológicos (Brisuda *et al.*, 2016; Casadio *et al.*, 2013; Catarino, 2008; Catarino *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2018; Leon, Shapiro, Sklaroff, & Yaros, 1977; Sozzi *et al.*, 2003; Szarvas *et al.*, 2007; M. Zancan *et al.*, 2006). Estes níveis, além de se relacionarem inversamente com a sobrevivência (Gautschi *et al.*, 2004), são proporcionais ao estadio tumoral, e, em alguns casos, especificamente em cancro da bexiga músculo-invasivo, quase todo o conteúdo de cfDNA do plasma provém do tumor (Rink, Schwarzenbach, Riethdorf, & Soave, 2018; Szarvas *et al.*, 2007).

Além do plasma, também foram encontradas concentrações elevadas de cfDNA noutros fluídos corporais, como fluído pleural (Chan *et al.*, 2003) e urina (Lu & Li, 2017). A presença de material genético na urina (DNA urinário, uDNA) foi primeiramente associada a células urinárias (Lu & Li, 2017), mas mais tarde também se detetou a presença de ucfDNA (urinary cell-free DNA). Este ucfDNA apresenta as mesmas alterações genéticas que os tumores primários, e possui boa estabilidade, ao contrário de RNA e enzimas (Ward & Bryan, 2017). Contudo, o ucfDNA tem um menor intervalo de tempo de deteção que o cfDNA plasmático, sugerindo que os contaminantes urinários (como as enzimas DNase I e DNase II) desempenham um papel na sua degradação (Salvi *et al.*, 2016). Assim, as amostras devem ser preparadas para centrifugação e armazenamento o mais cedo possível após a recolha de urina (Salvi *et al.*, 2016).

Considerando também que a urina contém níveis menores de proteínas que o sangue, o isolamento de fragmentos de DNA deverá ser tecnicamente mais fácil (Lu & Li, 2017), tornando a urina uma importante nova fonte de material genético tumoral. No entanto, ainda não existe um método padrão na deteção e quantificação de ucfDNA, e como os passos da sua extração nem sempre são bem detalhados, as concentrações de ucfDNA tendem a variar bastante (X. Han *et al.*, 2017).

Outro fator que dificulta a deteção de cfDNA tumoral é a presença de cfDNA nativo, encontrado quer em situação oncológica, quer em situação saudável (Ignatiadis, Lee, & Jeffrey, 2015). Num estadio inicial da doença (e em alguns casos de micrometástase), o cfDNA tumoral pode representar uma subpopulação excecionalmente rara dentro do cfDNA total, a níveis correspondentes a 1 equivalente de genoma em 5 mL de plasma (<0,01% de fração alélica), e pode ser indetetável em volumes plasmáticos usados tipicamente nas amostras (Ignatiadis *et al.*, 2015). Em doentes oncológicos de cancro da bexiga, o DNA tumoral é detetável em mais de 70% das amostras de urina, sendo possível discriminar entre doente oncológico e controlo saudável (Brisuda *et al.*, 2016).

O ucfDNA origina-se tanto de células exfoliadas na urina pelo trato urogenital, como de cfDNA na circulação, que passa pela filtração glomerular (Figura VIII). Este último também é conhecido como DNA transrenal (Lu & Li, 2017). De acordo com o seu tamanho, os fragmentos de ucfDNA podem ser classificados em 2 categorias: DNA de elevado peso molecular e DNA de baixo peso molecular (Lu & Li, 2017). O primeiro atinge normalmente 1 kbp ou mais, e é derivado de células necróticas provenientes do trato urogenital, embora tenham sido encontrados fragmentos com 1,3kbp e 19 kbp em urina de homem e mulher, respetivamente (Lu & Li, 2017). O DNA de baixo peso molecular (180–200 bp) pode originar de células em circulação ou em apoptose, que estejam em contato com a urina (Lu & Li, 2017; Rink *et al.*, 2018).

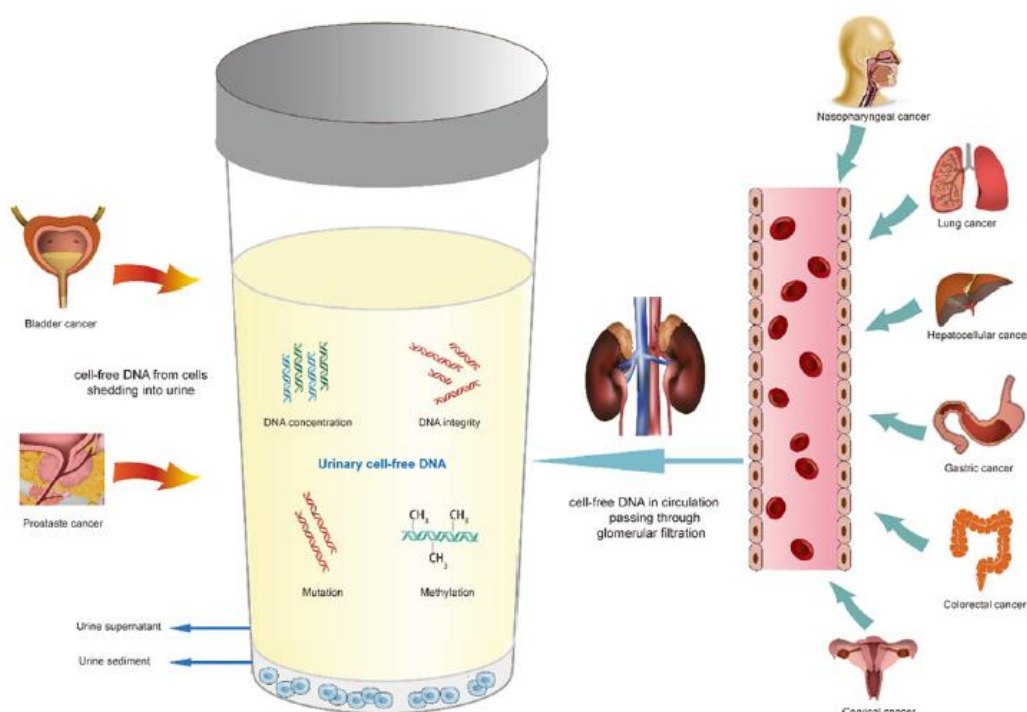


Figura VIII – Origens de ucfDNA. Adaptado de Lu & Li, 2017.

A nível da sua obtenção e separação, o ucfDNA situa-se no sobrenadante urinário, enquanto que o DNA genómico, proveniente das células exfoliadas, se encontra no sedimento (Ward & Bryan, 2017). Apesar de se usar mais rotineiramente o sedimento para extração de DNA, existem evidências de que o ucfDNA pode recapitular mais fielmente o DNA tumoral total (Russo *et al.*, 2018). Após isolamento do ucfDNA, este pode ser usado no diagnóstico de cancro, vigilância da progressão tumoral, prognóstico e resposta à terapêutica (Lu & Li, 2017).

Vários são os marcadores propostos para detecção de cfDNA, tanto no sangue como em urina, como biomoléculas capazes de diagnosticar cancro da bexiga. Um deles é o gene *hTERT* (e enzima associada).

1.3. Gene *hTERT*

O gene *hTERT* localiza-se no *locus* 5p15.33 (Sozzi *et al.*, 2003), e codifica a proteína telomerase, uma transcriptase reversa, responsável pela manutenção dos telómeros. Tanto o promotor central como as 330 bp a montante do codão ATG são ricos em nucleótidos GC, possuindo locais de ligação a vários fatores de transcrição, como os supressores tumorais p53, WT1 e Menin, e as oncoproteínas c-Myc, HIF-1 e AP2 (Figura IX) (Ramlee, Wang, Toh, & Li, 2016).

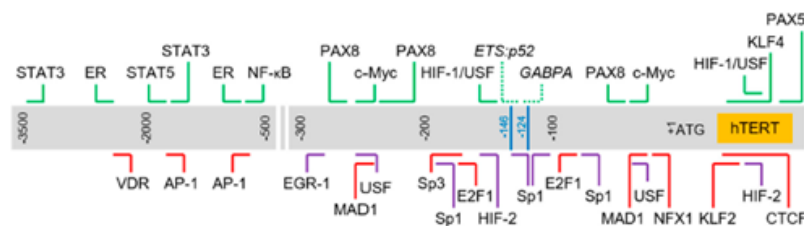


Figura IX – Representação esquemática dos locais *cis* no promotor *hTERT*. A caixa cinzenta representa a sequência cromossômica, desde 3,5 kb a jusante e 150 bp a montante do local de início de transcrição (+1). As linhas horizontais indicam aproximadamente os locais de ligação dos respetivos fatores de transcrição. Linhas azuis: mutações *hotspot* promotoras (“-124” corresponde à mutação C228T; “-146” corresponde à mutação C250T); linhas verdes: ativadores da transcrição; linhas vermelhas: repressores; linhas roxas; reguladores com papel dual; linhas a tracejado: regulador ligado a local originado a partir de mutações *hotspot*. Adaptado de Ramlee *et al.*, 2016.

1.3.1. Telómeros

Os telómeros consistem em repetições dos nucleótidos 5’-TTAGGG-3’, terminando numa sequência de cadeia simples, rica em nucleótidos 3’-G. Acoplado às sequências repetitivas, encontra-se um complexo proteico protetor, denominado *Shelterin*, capaz de reconhecer quebras da cadeia dupla de DNA (Ramlee *et al.*, 2016). Estas estruturas localizam-se nas extremidades dos cromossomas, protegendo-as da degradação, da fusão de extremidades e da recombinação, mantendo assim a estabilidade cromossômica. Nos humanos, o seu comprimento varia entre as 7 e as 12 kbp (Ramlee *et al.*, 2016).

Durante o processo replicativo, a DNA polimerase não consegue sintetizar a cadeia complementar da extremidade 3’, o que encurta gradualmente os telómeros, a um ritmo de 50–200 bp por cada divisão celular (Janknecht, 2004). Este progressivo encurtamento determina o potencial replicativo destas células, atuando como um relógio interno (Ramlee *et al.*, 2016). Quando é atingido um comprimento crítico, o complexo *Shelterin* deixa de estar ligado ao telómero, e iniciam-se vias de

sinalização para senescência e morte celular (Ramlee *et al.*, 2016). Apesar disso, mesmo após atingirem o comprimento telomérico crítico, as células cancerígenas continuam a dividir-se, ficando genomicamente instáveis (Machiela *et al.*, 2017).

Por outro lado, um maior comprimento dos telómeros está associado à diminuição da mortalidade celular (Janknecht, 2004) e é considerado um fator de risco para vários tipos de tumores, como o melanoma, cancro do pulmão, ovário, leucemia linfóide crónica e glioma, ao conferir propriedades de crescimento imortal (Machiela *et al.*, 2017).

Além da associação entre o gene *hTERT* e o processo oncológico, Devonshire e colaboradores (Devonshire *et al.*, 2014) observaram que os *loci* adjacentes aos telómeros são mais abundantes no DNA livre circulante que *loci* mais centroméricos.

Deste modo, neste estudo vai ser avaliada a expressão do gene *hTERT*, não como um biomarcador tumoral de cancro da bexiga, mas sim como indicador da presença de cfDNA (Catarino *et al.*, 2012), tanto em plasma como em urina.

2. Objetivos

Considerando que ainda existe escassez de estudos sobre o poder da análise genómica da urina no diagnóstico, prognóstico e recidiva de tumores da bexiga, o objetivo principal deste estudo consiste na aplicação de uma metodologia simples e não-invasiva, capaz de auxiliar o diagnóstico complementar de cancro da bexiga.

Para tal, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- Delineamento de um teste quantitativo de DNA em amostras de urina e plasma, baseado na tecnologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo-real, através da amplificação do marcador *hTERT*;
- Avaliação do poder da quantificação de DNA livre na urina e plasma como marcador de diagnóstico em doentes com cancro da bexiga.

Com os resultados deste estudo, pretende-se que as suas aplicações incluam a utilização deste ensaio molecular como marcador de diagnóstico precoce em doentes com cancros urológicos, bem como a monitorização da carga e heterogeneidade tumoral.

3. Métodos

3.1. População-alvo

Para a realização deste estudo foram recolhidas amostras, de modo aleatório e representativo, de urina e sangue periférico de 36 indivíduos com cancro da bexiga e 40 indivíduos-controlo, no Serviço de Urologia da Unidade Local de Saúde de Matosinhos. Consideraram-se como critérios de inclusão doentes que apresentassem tumor primário diagnosticado na Unidade Local de Saúde de Matosinhos, e que tenham sido tratados nesta Instituição. A recolha de amostras dos indivíduos-controlo foi realizada simultaneamente à dos indivíduos doentes, considerando-se como critérios de inclusão a ausência de doença oncológica e/ou patologia urológica na data de recolha das amostras.

3.2. Recolha e preparação das amostras

Após colheita de urina e sangue periférico dos doentes, o isolamento de cfDNA destas amostras foi realizado através de um kit comercial (urina – GRS Genomic DNA Kit – Card – GK25.0100, GRiSP; plasma – GRS Genomic DNA Kit – Blood & Cultured Cells – #GK02.100, GRiSP), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.1. Extração de cfDNA a partir de plasma

O cfDNA foi extraído com recurso ao kit comercial GRS Genomic DNA Kit – Blood & Cultured Cells – #GK02.100, GRiSP.

Foram transferidos 300 µL de plasma (a partir de um tubo com EDTA ou outro anticoagulante) para um tubo eppendorf de 1,5 mL, acrescentando-se 30 µL de Proteínase K (10 mg/mL). Depois de misturar, incubaram-se (*Benchmark Digital Heat Block*) as amostras a 60°C durante 15 minutos, com inversões regulares.

De seguida, adicionaram-se 200µL de Buffer C1 e misturou-se vigorosamente. As amostras foram incubadas (*Benchmark Digital Heat Block*) a 70°C durante 15 minutos. Nesta etapa, os tubos foram invertidos regularmente, e o *Elution Buffer* pré-aquecido (*Benchmark Digital Heat Block*) a 70 °C.

Adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto (96-100%), agitando vigorosamente durante 10 segundos. A mistura foi transferida para uma coluna de spin e centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g durante 5 minutos, a 15 °C. O *flow-through* foi descartado, e colocou-se a coluna de spin num novo tubo coletor de 2 mL.

Adicionaram-se 400 µL de *Wash Buffer 1*, centrifugando-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g, durante 30 segundos, a 15 °C. O *flow-through* foi descartado e a coluna de spin foi colocada no mesmo tubo coletor. Adicionaram-se 600 µL de *Wash Buffer 2*, e centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g, durante 30 segundos, a 15 °C. Descartou-se o *flow-through*, tendo-se colocado a coluna de spin no mesmo tubo coletor. Para secar a coluna de spin, centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g durante 3 minutos a 15 °C. Tanto o *flow-through* como o tubo coletor foram descartados, e a coluna de spin foi colocada num novo tubo eppendorf de 1,5 mL.

Pipetaram-se 75 µL de *Elution Buffer* (pré-aquecido a 70 °C) diretamente no centro da coluna, e esta mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 4 minutos. Centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g durante 30 segundos, a 15 °C, descartando a coluna de spin. O cfDNA obtido foi utilizado imediatamente, ou congelado a -20 °C.

Através do software *NanoDrop* (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*), quantificou-se espectralmente o cfDNA.

3.2.2. Extração de ucfDNA a partir de urina

O ucfDNA foi extraído com recurso ao kit comercial GRS Genomic DNA Kit – Card – GK25.0100, GRiSP.

Foi pipetado 1 ml de urina para um tubo eppendorf de 1,5 mL, tendo-se procedido a uma centrifugação (*GYROZEN 1730R*) inicial a 1000g, durante 10 minutos, a 15 °C. O sobrenadante foi decantado para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL, tendo-se descartado o *pellet*. De seguida, realizou-se uma segunda centrifugação (*GYROZEN 1730R*) a 3000g durante 10 minutos, a 15 °C, tendo-se decantado o sobrenadante para um tubo eppendorf de 1,5 mL, descartando-se o *pellet*. A este sobrenadante adicionaram-se 500 µL de *Elution Buffer*, vortexou-se a mistura durante 5 segundos, e centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 6000g durante 2 minutos, a 15 °C, descartando-se o sobrenadante originado.

Adicionaram-se 200 µL de *Buffer C2* e 20 µL de Proteínase K (10 mg/mL), vortexando ligeiramente. Incubou-se a mistura (*Benchmark Digital Heat Block*) a 60 °C durante 30 minutos, com inversões regulares do tubo. Após o período de incubação, adicionaram-se 200 µL de *Buffer C1* (com RNA Carrier Solution), vortexando. Após incubação (*Benchmark Digital Heat Block*) a 60 °C durante 20 minutos, com inversões regulares do tubo, este foi centrifugado brevemente, sendo o lisado transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL.

A este tubo adicionaram-se 200 µL de etanol (96-100%), misturando-se por agitação vigorosa durante 10 segundos. Qualquer precipitado que tenha aparecido foi destruído por *up-and-down* da micropipeta. Colocou-se a mistura numa coluna de spin, e centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g,

a 15 °C, durante 2 minutos. Descartou-se o *flow-through*, e colocou-se coluna de spin num novo tubo coletor de 2 mL.

Adicionaram-se 400 µL de *Wash Buffer 1*, centrifugando-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g, durante 30 segundos, a 15 °C. O *flow-through* foi descartado e a coluna de spin foi colocada no mesmo tubo coletor. Adicionaram-se 600 µL de *Wash Buffer 2*, e centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g, durante 30 segundos, a 15 °C. Descartou-se o *flow-through*, tendo-se colocado a coluna de spin no mesmo tubo coletor. Para secar a coluna de spin, centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g durante 3 minutos a 15 °C. Tanto o *flow-through* como o tubo coletor foram descartados, e a coluna de spin foi colocada num novo tubo eppendorf de 1,5 mL.

Pipetaram-se 50 µL de *Elution Buffer* (pré-aquecido a 60 °C) diretamente no centro da coluna, e esta mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 3 minutos. Centrifugou-se (*GYROZEN 1730R*) a 15000g durante 1 minuto, a 15 °C, descartando a coluna de spin. O ucfDNA obtido foi utilizado imediatamente, ou congelado a -20 °C.

Através do software *NanoDrop* (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific*), quantificou-se espectralmente o ucfDNA.

3.3. Amplificação do DNA circulante

A amplificação do DNA livre nas amostras foi realizada pela metodologia de PCR em tempo-real, baseada na monitorização contínua da fluorescência num sistema ótico, através do sistema Taqman®.

Os *primers* e sondas foram desenhados anteriormente por Sozzi e colaboradores para amplificar um fragmento do gene *hTERT* (Sozzi *et al.*, 2003). A tabela IV indica as sequências dos *primers* e sonda usados na amplificação.

Tabela IV – Sequência nucleotídica dos *primers* e sonda usados na amplificação do gene *hTERT* (Sozzi *et al.*, 2003)

| Gene | Sequência dos <i>primers</i> |
|--------------|---|
| <i>hTERT</i> | Primer forward: 5'-GGC ACA CGT GGC TTT TCG- 3' |
| | Primer reverse: 5'- GGT GAA CCT CGT AAG TTT ATG CAA- 3' |
| | Sonda: VIC 5'- TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3' TAMRA |

A reação ocorreu no sistema *ABIPRISM 7300* (*Applied Biosystems*) e as condições foram executadas de acordo com o previamente descrito (Tabelas V e VI), após otimização de acordo com as condições laboratoriais (Catarino, 2008; Catarino *et al.*, 2012). Foram preparadas soluções stock dos *primers* e da sonda, a partir das soluções mãe, com uma concentração final de 10 µM.

Tabela V – Componentes e respetivos volumes necessários para a preparação da mistura de reação na amplificação do gene *hTERT* (Catarino, 2008; Catarino *et al.*, 2012)

| Reagentes | V (μ L) (1 reação) | Concentração final |
|---|-------------------------|--------------------|
| <i>TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystem)</i> | 12,5 | 1x |
| Sonda | 0,95 | 375 nM |
| <i>Primer forward</i> | 0,63 | 250 nM |
| <i>Primer reverse</i> | 0,63 | 250 nM |
| ddH ₂ O | 7,79 | --- |
| (u)cfDNA | 2,5 | --- |
| Total | 25 | --- |

As amostras dos doentes foram amplificadas em duplicado, e realizaram-se duplicados de brancos (água destilada), como controlo negativo. As curvas de calibração foram calculadas de acordo com uma série de diluições do reagente *TaqMan Control Human Genomic DNA Standard (Applied Biosystems)*, a 10 ng/ μ L: 1, 0.1, 0.01, 0.001 e 0.0001 ng/ μ L. A partir da curva de calibração, calculou-se a concentração de DNA livre de cada amostra. Os resultados foram analisados pelo *software 7300 System–SDS Software (version 1.2.3) Sequence Detection Software (Applied Biosystems)*.

Tabela VI – Perfil térmico de PCR usado na amplificação do gene *hTERT* (Catarino, 2008; Catarino *et al.*, 2012)

| Etapa | Temperatura | Tempo | Nº ciclos |
|----------------------|-------------|-------------|-----------|
| Desnaturação inicial | 50 °C | 2 minutos | 1 |
| | 95 °C | 10 minutos | 1 |
| Desnaturação | 95 °C | 15 segundos | 50 |
| Emparelhamento | 60 °C | 1 minuto | |
| Extensão final | 60 °C | 1 minuto | 1 |

3.4. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados recorreu ao programa estatístico SPSS (Versão 25.0).

As concentrações de DNA em indivíduos saudáveis e doentes oncológicos foram comparadas utilizando testes estatísticos adequados à normalidade das distribuições (teste *t-student*), e consideraram-se estatisticamente significativos valores de $p \leq 0.05$.

3.5. Recursos humanos e materiais utilizados

Os recursos humanos envolvidos compreenderam pessoal médico, técnico e de enfermagem da Unidade Local de Saúde de Matosinhos.

A metodologia experimental e equipamento necessário à realização do projeto estão presentes e otimizados na UMIB (Unidade Multidisciplinar de Investigação em Biomedicina), laboratório UNIO (Unidade de Investigação em Oncologia).

4. Resultados

4.1. Perfil demográfico e clínico da população controlo e doente

Após recolha das amostras de sangue e urina, construíram-se as tabelas VII e VIII, que representam, respetivamente, o perfil demográfico e clínico da população em estudo.

Tabela VII – Perfil demográfico dos indivíduos doentes e indivíduos controlo

| | | Casos | | Total |
|---------------------------------|------------------|----------------|----------------|-------|
| | | Controlos | Doentes | |
| Género | Masculino, N (%) | 35 (87,5%) | 29 (80,6%) | 64 |
| | Feminino, N (%) | 5 (12,5%) | 7 (19,4%) | 12 |
| Total | | 40 (52,6%) | 36 (47,4%) | 76 |
| Idade, anos \pm desvio-padrão | | 62,9 \pm 1,7 | 71,7 \pm 1,7 | --- |

Como se observa pela tabela VII, tanto a população controlo como a dos doentes oncológicos é composta maioritariamente por indivíduos do género masculino (87,5% e 80,6%, respetivamente), com 12,5% e 19,4% de pessoas do género feminino. A população controlo representa 52,6% dos casos analisados, e a população doente representa 47,4%.

A idade média dos controlos é de 62,9 anos, enquanto que a idade média da população com cancro da bexiga é de 71,7 anos (Figura X).

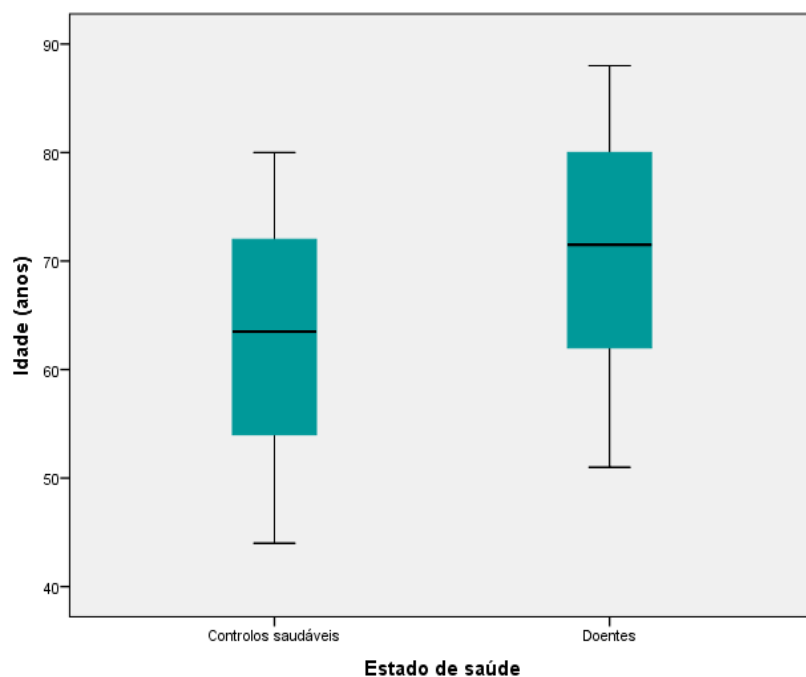


Figura X – Representação gráfica da idade média, em anos, dos controlos saudáveis e dos doentes oncológicos. A barra preta horizontal representa a média de idades, em anos; as projeções representam o valor mínimo e máximo.

O perfil clínico da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga está presente na tabela VIII.

Tabela VIII – Perfil clínico da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga

| Dados clínicos | Casos | | Total |
|--------------------------------------|------------|------------|------------|
| | Controlos | Doentes | |
| Saudável | 33 (82,5%) | 0 | 33 |
| Alterações reativas, sem malignidade | 7 (17,5%) | 0 | 7 |
| Estadio | | | |
| PUNLMP | 0 | 2 (5,5%) | 2 |
| Ta | 0 | 15 (41,7%) | 15 |
| T1 | 0 | 13 (36,1%) | 13 |
| ≥T2 | 0 | 6 (16,7%) | 6 |
| Total | 40 (52,6%) | 36 (47,4%) | 76 |
| Hematúria | | | |
| Ausência | 6 (66,7%) | 3 (33,3%) | 9 (24,3%) |
| Presença | 7 (25,0%) | 21 (75,0%) | 28 (75,7%) |
| | n.d. | | 39 |
| Hábitos tabágicos | | | |
| Não fumador | 5 (50,0%) | 5 (50,0%) | 10 (23,3%) |
| Ex-fumador | 10 (58,8%) | 7 (41,2%) | 17 (39,5%) |
| Fumador | 7 (43,7%) | 9 (56,3%) | 16 (37,2%) |
| | n.d. | | 33 |

Analisando a tabela VIII, conclui-se que 5,5% dos casos de doença correspondem ao estadio PUNLMP, 41,7% ao estadio Ta, 36,1% ao estadio T1 e 16,7% ao estadio ≥T2, com a população controlo a compor 52,6% dos casos analisados. Também se observa que os hábitos tabágicos apresentam uma distribuição semelhante entre controlos e população doente (50,0% e 50,0% para não fumadores; 58,8% e 41,2% para ex-fumadores; 43,7% e 56,3% para fumadores), e há maior prevalência de hematúria em doentes com cancro da bexiga (75,0%).

4.2. Concentrações de DNA circulante no plasma

Após amplificação do DNA por PCR *real-time*, e análise pelo *software 7300 System–SDS Software (version 1.2.3) Sequence Detection Software (Applied Biosystems)*, foram obtidas as concentrações de DNA livre para a população controlo e para os doentes com cancro da bexiga. As concentrações de cfDNA, referentes às amostras de plasma e estratificadas pelo estadio, estão presentes na tabela IX. A figura XI representa graficamente estas concentrações.

Tabela IX – Concentrações de cfDNA da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga, estratificadas pelo estadio

| | | [cfDNA] (ng/μL) | Total, N |
|--------------------------------------|--------|-----------------|----------|
| Saudável | | 0,012 ± 0,004 | 17 |
| Alterações reativas, sem malignidade | | | |
| Estadio | PUNLMP | | |
| | Ta | 0,020 ± 0,013 | 5 |
| | T1 | 0,038 ± 0,018 | 6 |
| | ≥T2 | 3,430 ± 3,415 | 3 |
| | | 0,759 ± 0,731 | 14 |

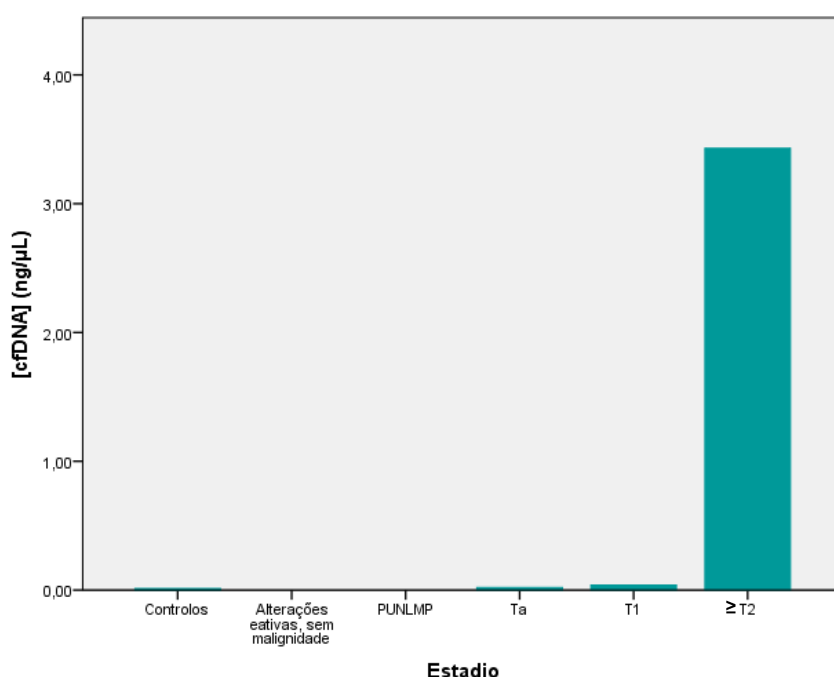


Figura XI – Gráfico de barras que relaciona as concentrações de cfDNA, em amostras de plasma, com a ausência ou presença de doença (com o respetivo estadio).

Como se observa pela figura XI e pela tabela IX, existe um aumento de cerca de 285 vezes na [cfDNA] entre controlos saudáveis e doentes ≥T2, enquanto os outros estadios apresentam concentrações muito semelhantes. Para verificar se havia diferenças estatisticamente significativas entre estadios, foram comparadas as concentrações entre estadios, recorrendo ao teste *t-student*. Os resultados encontram-se na tabela X.

Tabela X – Análise estatística das concentrações de cfDNA obtidas para os diferentes estadios

| Análise | N | Média ± desvio-padrão | p |
|--------------------------------|----------|--------------------------------|-------|
| T1 vs ≥T2 | 6 vs 3 | 0,038 ± 0,018 vs 3,430 ± 3,415 | 0,425 |
| Ta & T1 vs ≥T2 | 11 vs 3 | 0,030 ± 0,011 vs 3,430 ± 3,415 | 0,424 |
| Controlos saudáveis vs ≥T2 | 17 vs 3 | 0,012 ± 0,004 vs 3,430 ± 3,415 | 0,422 |
| Controlos saudáveis vs Doentes | 17 vs 14 | 0,012 ± 0,004 vs 0,759 ± 0,731 | 0,326 |

Por análise da tabela X, observa-se que nenhuma das análises tem valor estatisticamente significativo. A figura XII explicita a média da concentração de cfDNA para os controlos saudáveis e para os doentes oncológicos, com a respetiva análise estatística.

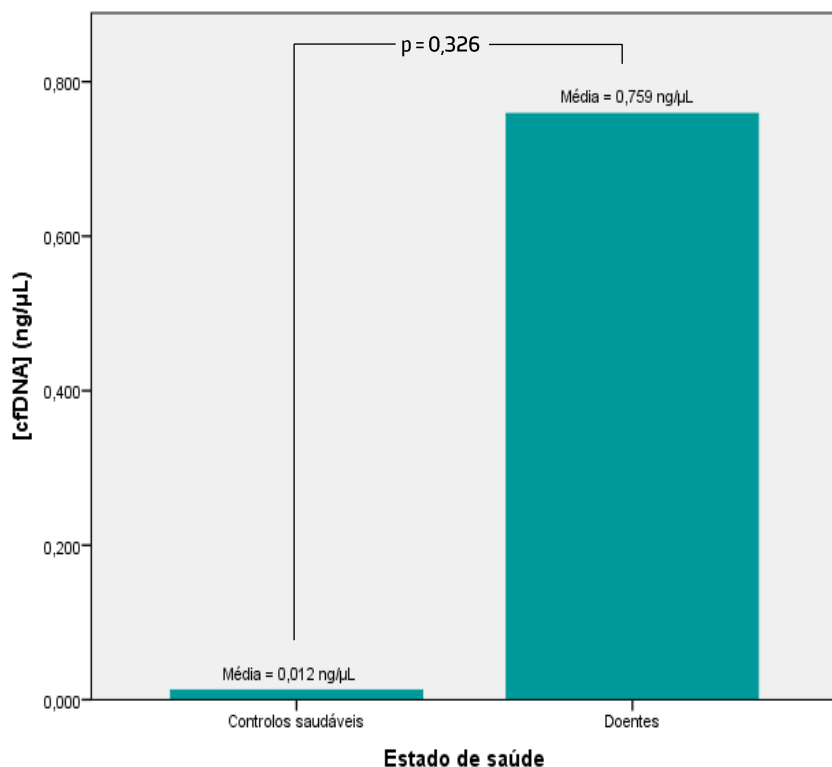


Figura XII – Média da [cfDNA] para os controlos saudáveis e para os doentes oncológicos, com a respetiva análise estatística.

Analisando a figura XII, observa-se que a média da concentração de cfDNA na população doente é cerca de 63 vezes superior à média obtida para a população saudável.

4.3. Concentrações de DNA circulante na urina

As concentrações de ucfDNA, referentes às amostras de urina e estratificadas pelo estadió, estão presentes na tabela XI. A partir desta tabela, construiu-se o gráfico representado na figura XIII.

Tabela XI – Concentrações de ucfDNA da população controlo e dos doentes com cancro da bexiga, estratificadas pelo estadió

| Estadió | [ucfDNA] (ng/μL) | | Total, N | |
|---------|------------------|---------------|--------------------------------------|-------|
| | Subcategoria | Valor | Subcategoria | Valor |
| | Saudável | 0,58 ± 0,36 | Alterações reativas, sem malignidade | 17 |
| | | | | 2 |
| | | | 2 | 24 |
| | PUNLMP | 0,00 ± 0,00 | | |
| | Ta | 15,99 ± 15,98 | 10 | |
| | T1 | 18,30 ± 18,22 | 7 | |
| | ≥T2 | 34,53 ± 26,27 | 5 | |

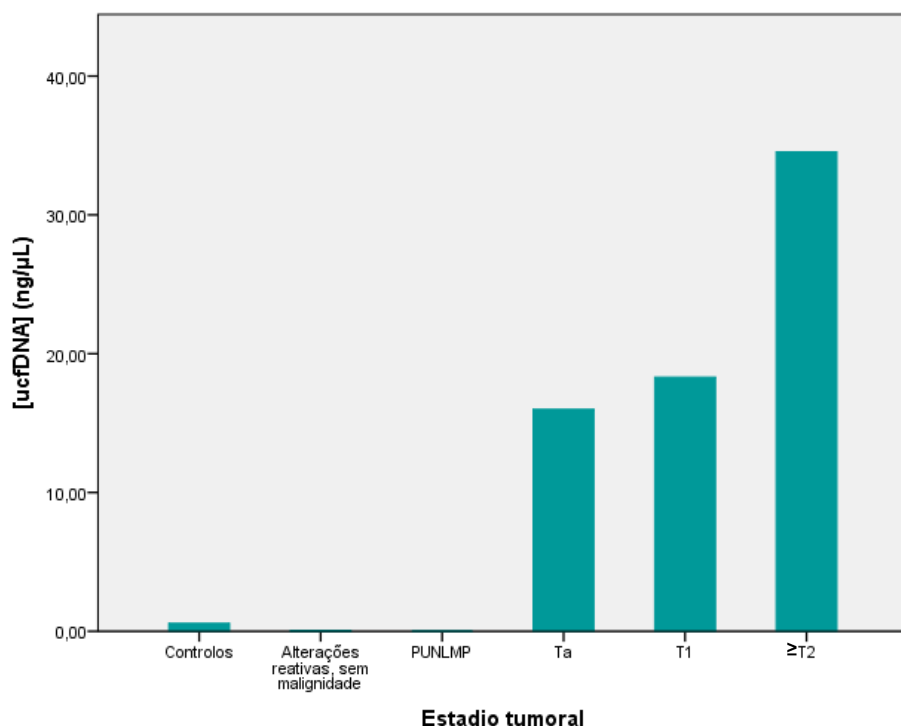


Figura XIII – Gráfico de barras que relaciona as concentrações de ucfDNA, em amostras de urina, com a ausência ou presença de doença (com o respetivo estadio).

Como se observa pela figura XIII e pela tabela XI, existe um aumento de cerca de 66 vezes na [ucfDNA] entre controlos e doentes $\geq T2$, havendo uma tendência de aumento das concentrações, à medida que se avança no estadio tumoral. Para verificar se havia diferenças estatisticamente significativas entre estadios, foram comparadas as concentrações entre estadios, recorrendo ao teste *t-student*. Os resultados encontram-se na tabela XII.

Tabela XII – Análise estatística das concentrações de ucfDNA obtidas para os diferentes estadios

| Análise | N | Média \pm desvio-padrão | p |
|----------------------------------|----------|--|-------|
| Ta vs T1 | 10 vs 7 | 15,99 \pm 15,98 vs 18,30 \pm 18,22 | 0,925 |
| Ta & T1 vs $\geq T2$ | 17 vs 5 | 16,94 \pm 11,66 vs 34,53 \pm 26,27 | 0,564 |
| T1 vs $\geq T2$ | 7 vs 5 | 18,30 \pm 18,22 vs 34,53 \pm 26,27 | 0,626 |
| Controlos saudáveis vs $\geq T2$ | 19 vs 5 | 0,52 \pm 0,33 vs 34,53 \pm 26,27 | 0,265 |
| Controlos saudáveis vs Doentes | 19 vs 24 | 0,52 \pm 0,33 vs 19,19 \pm 9,78 | 0,069 |

Por análise da tabela XII, observa-se que nenhuma das análises tem valor estatisticamente significativo, apesar de se ver uma tendência para a significância estatística na análise entre controlos saudáveis e doentes oncológicos ($p=0,069$). A figura XIV explicita a média da concentração de ucfDNA para os controlos saudáveis e para os doentes oncológicos, com a respetiva análise estatística.

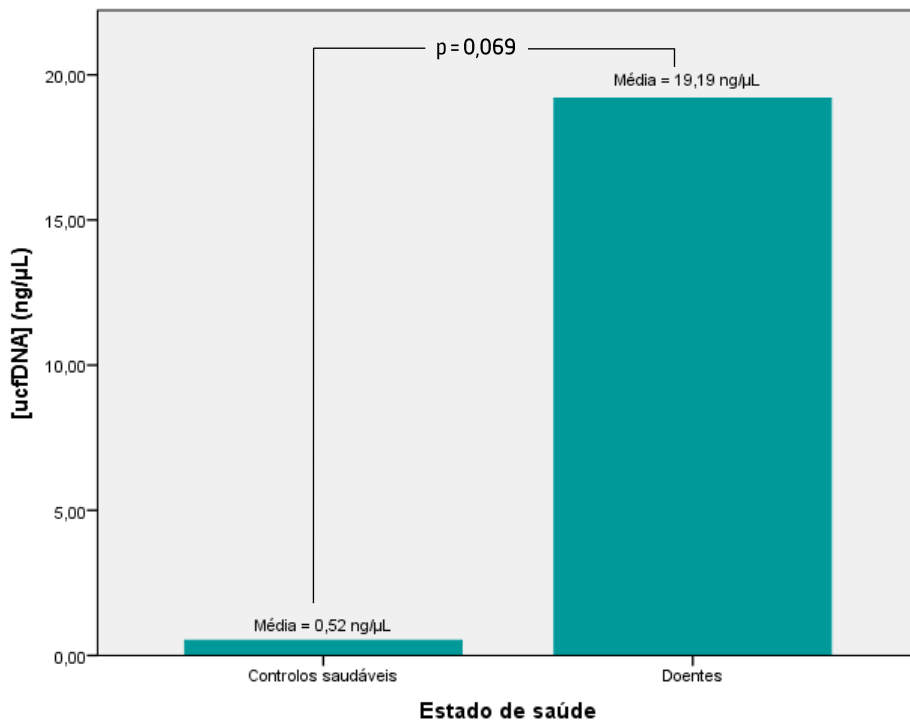


Figura XIV – Média da [ucfDNA] para os controlos saudáveis e para os doentes oncológicos, com a respetiva análise estatística.

Analisando a figura XIV, observa-se que a média da concentração de ucfDNA na população controlo é cerca de 37 vezes inferior à da população doente.

5. Discussão

A neoplasia da bexiga continua a ser dos cancros mais caros de tratar por cada caso incidente, devido ao seguimento realizado através da cistoscopia. Além da baixa *performance* dos atuais métodos de diagnóstico, principalmente em doença inicial, há também uma ausência de testes não invasivos e de baixo custo, que possam ser utilizados no diagnóstico precoce, vigilância e tratamento desta doença.

Para colmatar esta lacuna, têm sido pesquisados novos biomarcadores, nomeadamente o cfDNA e o ucfDNA, obtidos através de biópsias líquidas. Estas biomoléculas são de fácil obtenção e têm mostrado potencial como ferramentas de diagnóstico, permitindo a deteção precoce de doença oncológica.

Com o presente estudo, pretendeu-se aplicar a metodologia de PCR em tempo real como ferramenta de diagnóstico complementar não invasiva, através da quantificação de DNA livre na urina e plasma, por amplificação do gene *hTERT*.

Relativamente aos ácidos nucleicos livres, já foram realizados alguns estudos sobre o seu potencial na deteção e distinção entre doentes oncológicos, doentes com doenças urológicas benignas e pessoas saudáveis.

Num dos primeiros estudos referentes a DNA livre em plasma/soro, Leon e colaboradores (Leon *et al.*, 1977) realizaram uma análise por RIA (*Radioimmunoassay*), onde obtiveram concentrações de cfDNA de 0,013 e 0,180 ng/ μ L, em controlos e doentes com diversos tipos de cancro, respetivamente.

Por sua vez, Sozzi e colaboradores amplificaram o gene *hTERT* em tempo real, e obtiveram concentrações de cfDNA no plasma de 0,243 ng/ μ L e 0,031 ng/ μ L em doentes com cancro do pulmão e controlos, respetivamente (Sozzi *et al.*, 2003). Gautschi e colaboradores, em 2004, mediram os níveis de cfDNA no soro e plasma de doentes com NSCLC (*Non-Small Cell Lung Cancer*) e controlos. Recorreram a qPCR de um plasmídeo que continha o gene da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase, obtendo concentrações no plasma e soro de doentes de 0,037 e 0,396 ng/ μ L, respetivamente, e de 0,018 e 0,126 ng/ μ L no plasma e soro de controlos (Gautschi *et al.*, 2004).

Em 2008, Catarino e colaboradores amplificaram o gene *hTERT* por qPCR, como medida de cfDNA em controlos e doentes com cancro da mama, obtendo concentrações de 0,0771 ng/ μ L e 0,1052 ng/ μ L em controlos e doentes, respetivamente (Catarino, 2008). Em 2012, este grupo aplicou o mesmo procedimento a doentes com NSCLC, obtendo concentrações de 0,1227 ng/ μ L e 0,270 ng/ μ L em controlos e doentes, respetivamente (Catarino *et al.*, 2012).

Lee e colaboradores mediram a concentração de cfDNA e de exoDNA (DNA exossomal), obtendo valores de 0,0176 ng/ μ L e de 0,0039 ng/ μ L, em doentes com carcinoma urotelial da bexiga (Lee *et al.*, 2018).

Contudo, Casadio e colaboradores (Casadio *et al.*, 2013) não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre doentes com cancro da próstata e controlos, apesar de obterem concentrações de cfDNA de 6 ng/ μ L. Além disso, na avaliação da integridade do cfDNA, por amplificação 3 oncogenes (*c-MYC*, *BCAST* e *HER2*), não houve correlação entre esta e a [cfDNA] (Casadio *et al.*, 2013).

O nosso estudo apresenta resultados semelhantes, na medida em que não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na concentração de cfDNA plasmático entre doentes com cancro da bexiga e controlos saudáveis (Figura XII e Tabela X). Estes resultados podem ser explicados pelo fato da doença em estudo ser o carcinoma urotelial da bexiga, patologia distinta das analisadas por Sozzi, Gautschi e Catarino. Além disso, como já referido, o sangue é um ambiente homeostático, o que pode dificultar o isolamento e quantificação de cfDNA (Gao, 2013), cuja presença também poderá ser devida a outras enfermidades (Ignatiadis *et al.*, 2015). O reduzido número de amostras também diminui o poder estatístico destes resultados.

A nível do DNA livre presente na urina, Zancan e colaboradores avaliaram as concentrações de ucfDNA em 35 suspeitas de cancro da bexiga, e, em todos os doentes positivos para cancro, confirmados por cistoscopia, a concentração de ucfDNA era superior a 0,250 ng/ μ L, ao passo que menos de metade dos controlos (cistoscopia negativa) apresentavam o mesmo nível de concentração de ucfDNA (M. Zancan *et al.*, 2006). No entanto, a mesma equipa realizou outro estudo mais aprofundado em 2009, e chegaram à conclusão de que as concentrações de ucfDNA não podiam ser consideradas uma fonte fiável de biomarcadores diagnósticos para cancro da bexiga (Matelda Zancan *et al.*, 2009).

Tendo isto em conta, o estudo de Chang e colaboradores recorreu à normalização com os níveis de Creatinina urinária (UCr, *Urinary Creatinine*), obtendo resultados promissores na distinção entre presença ou ausência de doença oncológica ([ucfDNA] = 0,739 ng/ μ L/UCr em doentes e [ucfDNA] = $4,92 \times 10^{-6}$ ng/ μ L/UCr em controlos saudáveis) (Chang *et al.*, 2007). Contudo, foi proposto que os resultados inconsistentes na concentração de ucfDNA provinham de metodologias não standardizadas. Assim, Brisuda e colaboradores (Brisuda *et al.*, 2016) aplicaram um protocolo otimizado para a quantificação dos níveis deste tipo de ácidos nucleicos, e conseguiram discriminar entre cancro da bexiga e saúde.

Os resultados obtidos no presente estudo parecem ser promissores. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa (Tabela XII) nas concentrações de ucfDNA, entre controlos e doentes

com cancro da bexiga, observa-se um aumento da concentração de DNA livre à medida que se avança no estadió tumoral, sendo que o estadió $\geq T2$ apresenta a diferença mais substancial relativamente aos controlos saudáveis (Figura XIII). Além disso, o grupo de doentes apresenta uma concentração de DNA livre urinário cerca de 37 vezes superior à da população controlo (Figura XIV). É importante referir que os vários estudos realizados usaram diferentes metodologias, o que pode explicar as discrepâncias nos resultados obtidos. A metodologia usada neste trabalho mostrou ter poder discriminatório entre doentes e pessoas saudáveis, mesmo considerando o pequeno número de amostras. É de salientar o reduzido intervalo de tempo de deteção do ucfDNA (Salvi *et al.*, 2016), que pode ter influenciado o sucesso do protocolo de amplificação do ucfDNA, uma vez que nem sempre foi possível extrair estes ácidos nucleicos no tempo desejado.

Como se observa nas tabelas X e XII, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre estadios.

A nível do cfDNA, este resultado pode ser explicado pelo fato do estadió $\geq T2$ ser o único capaz de invadir a camada muscular da bexiga, e, daí, chegar à corrente sanguínea. Como os estadios Ta e T1 não são músculo-invasivos, os níveis de cfDNA destes estadios são muito semelhantes aos dos controlos.

No caso do ucfDNA, já se observam níveis mais elevados nos estadios mais iniciais, uma vez que a urina está em contato direto com as células cancerígenas. Além disso, como a urina não consegue manter a homeostasia, estes níveis retratam mais fielmente o estado tumoral do doente.

6. Conclusão

O recurso a biópsias líquidas, como o plasma e urina, tem mostrado potencial na sua utilização para aumentar o poder de diagnóstico de patologias oncológicas. À medida que mais estudos forem sendo realizados, mais otimizado ficará o processo de obtenção, isolamento e análise de ácidos nucleicos livres circulantes, o que resultará na obtenção de um método mais barato, rápido, indolor, preciso e precoce para a deteção de cancro da bexiga e de outros tipos de cancros. Além disso, existe a possibilidade de alargar esta metodologia ao tratamento, prognóstico e recidiva destas doenças, o que irá reduzir os custos associados, principalmente no carcinoma urotelial da bexiga.

Os resultados obtidos neste estudo, apesar de não serem estatisticamente significativos, são promissores, considerando que foi possível observar um aumento da [ucfDNA] com o avançar do estadio tumoral, e também se observou uma concentração elevada de cfDNA no estadio $\geq T2$, o mais avançado desta patologia. Utilizando esta metodologia, em vez de recorrer aos métodos *gold standard*, poderia ser possível reduzir os custos associados, e obter informação mais rápida, precisa e de modo mais inócuo.

Para validar estas descobertas, seria necessário ampliar a amostra estudada, não só da população controlo, mas também da população com doença oncológica, de modo a obter uma maior representação de cada um dos estadios em estudo.

Como perspetivas futuras, é objetivo deste estudo, ainda em fase inicial, analisar a influência de fatores de risco nesta quantificação, como os hábitos tabágicos e a presença ou ausência de hematuria. Além disso, será também relevante avaliar a utilização desta metodologia como marcador de prognóstico e recidiva tumoral de cancro da bexiga, e avaliar a sua aplicabilidade a outros cancros urológicos, como os da próstata e rim. Com o aumento do número de amostras e um maior tempo de seguimento dos doentes, irá ser possível calcular a especificidade e sensibilidade deste ensaio molecular, para identificar doentes com neoplasias urológicas, através da obtenção de curvas ROC.

7. Referências Bibliográficas

- Abboud, M. A., Topham, A. K., Parker, D. C. *et al.*, (2019). Risk of Ovarian Malignancy in Patients Undergoing Radical Cystectomy for Bladder Cancer. *Urology*, 123, 181-185. doi:10.1016/j.urology.2018.10.017
- Abdi, H., Elzayat, E., Cagiannos, I. *et al.*, (2018). Female radical cystectomy patients have a higher risk of surgical site infections. *Urol Oncol*. doi:10.1016/j.urolonc.2018.05.023
- Alfred Witjes, J., Lebet, T., Comperat, E. M. *et al.*, (2017). Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, 71(3), 462-475. doi:10.1016/j.eururo.2016.06.020
- Audenet, F., Sfakianos, J. P., Waingankar, N. *et al.*, (2019). A delay ≥ 8 weeks to neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy increases the risk of upstaging. *Urol Oncol*, 37(2), 116-122. doi:10.1016/j.urolonc.2018.11.011
- Babjuk, M., Burger, M., Zigeuner, R. *et al.*, European Association of, U. (2013). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol*, 64(4), 639-653. doi:10.1016/j.eururo.2013.06.003
- Brems-Eskildsen, A. S., Zieger, K., Toldbod, H. *et al.*, (2010). Prediction and diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary content of hTERT, SENP1, PPP1CA, and MCM5 transcripts. *BMC Cancer*, 10, 646-646. doi:10.1186/1471-2407-10-646
- Brisuda, A., Pazourkova, E., Soukup, V. *et al.*, (2016). Urinary Cell-Free DNA Quantification as Non-Invasive Biomarker in Patients with Bladder Cancer. *Urol Int*, 96(1), 25-31. doi:10.1159/000438828
- Carles, J., Esteban, E., Climent, M. *et al.*, Spanish Oncology Genito Urinary Group Study, G. (2007). Gemcitabine and oxaliplatin combination: a multicenter phase II trial in unfit patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer. *Ann Oncol*, 18(8), 1359-1362. doi:10.1093/annonc/mdm160
- Casadio, V., Calistri, D., Tebaldi, M. *et al.*, (2013). Urine cell-free DNA integrity as a marker for early bladder cancer diagnosis: preliminary data. *Urol Oncol*, 31(8), 1744-1750. doi:10.1016/j.urolonc.2012.07.013
- Catarino, R. (2008). Quantification of Free Circulating Tumor DNA as a Diagnostic Marker for Breast Cancer.
- Catarino, R., Coelho, A., Araujo, A. *et al.*, (2012). Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS One*, 7(6), e38559. doi:10.1371/journal.pone.0038559
- Chan, M. H. M., Chow, K. M., Chan, A. T. C. *et al.*, (2003). Quantitative Analysis of Pleural Fluid Cell-free DNA as a Tool for the Classification of Pleural Effusions. *Clinical Chemistry*, 49(5), 740. doi:10.1373/49.5.740
- Chang, H.-W., Tsui, K.-h., C Shen, L. *et al.*, (2007). *Urinary cell-free DNA as a potential tumor marker for bladder cancer* (Vol. 22).
- Comperat, E. M., Burger, M., Gontero, P. *et al.*, (2018). Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". *Eur Urol Focus*. doi:10.1016/j.euf.2018.01.003
- Dadhania, V., Czerniak, B., & Guo, C. C. (2015). Adenocarcinoma of the urinary bladder. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 3(2), 51-63.
- Devonshire, A. S., Whale, A. S., Gutteridge, A. *et al.*, (2014). Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(26), 6499-6512. doi:10.1007/s00216-014-7835-3
- Diaz, L. A., Jr., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*, 32(6), 579-586. doi:10.1200/JCO.2012.45.2011
- Dy, G. W., Gore, J. L., Forouzanfar, M. H. *et al.*, (2017). Global Burden of Urologic Cancers, 1990-2013. *Eur Urol*, 71(3), 437-446. doi:10.1016/j.eururo.2016.10.008

- Fuge, O., Vasdev, N., Allchorne, P. *et al.*, (2015). Immunotherapy for bladder cancer. *Res Rep Urol*, 7, 65–79. doi:10.2147/RRU.S63447
- Gao, Y. (2013). Urine—an untapped goldmine for biomarker discovery? *Sci China Life Sci*, 56(12), 1145–1146. doi:10.1007/s11427-013-4574-1
- Gautschi, O., Bigosch, C., Huegli, B. *et al.*, (2004). Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol*, 22(20), 4157–4164. doi:10.1200/JCO.2004.11.123
- Gupta, M., VandenBussche, C. J., & Bivalacqua, T. J. (2018). Urinary cytology and the Paris system for reporting urinary cytology: Implications for urological management. *Cytopathology*, 29(4), 368–370. doi:10.1111/cyt.12538
- Hafeez, S., & Huddart, R. (2013). Advances in bladder cancer imaging. *BMC Medicine*, 11, 104–104. doi:10.1186/1741-7015-11-104
- Han, D. S., Zhou, W., Seigne, J. D. *et al.*, (2018). Geographic Variation in Cystoscopy Rates for Suspected Bladder Cancer between Female and Male Medicare Beneficiaries. *Urology*, 122, 83–88. doi:10.1016/j.urology.2018.08.011
- Han, X., Wang, J., & Sun, Y. (2017). Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 15(2), 59–72. doi:10.1016/j.gpb.2016.12.004
- Ignatiadis, M., Lee, M., & Jeffrey, S. S. (2015). Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*, 21(21), 4786–4800. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1190
- Janknecht, R. (2004). On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Letters*, 564(1–2), 9–13. doi:10.1016/s0014-5793(04)00356-4
- Ke, Z., Lai, Y., Ma, X. *et al.*, (2014). Diagnosis of bladder cancer from the voided urine specimens using multi-target fluorescence in situ hybridization. *Oncol Lett*, 7(2), 325–330. doi:10.3892/ol.2013.1744
- Kim, D. K., Lee, J. Y., Jung, J. H. *et al.*, (2019). Role of adjuvant cisplatin-based chemotherapy following radical cystectomy in locally advanced muscle-invasive bladder cancer: Systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Investig Clin Urol*, 60(2), 64–74. doi:10.4111/icu.2019.60.2.64
- Knowles, M. A., & Hurst, C. D. (2015). Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*, 15(1), 25–41. doi:10.1038/nrc3817
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2015). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease* (Ninth edition.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
- Lavery, H. J., Zaharieva, B., McFaddin, A. *et al.*, (2017). A prospective comparison of UroVysion FISH and urine cytology in bladder cancer detection. *BMC Cancer*, 17(1), 247. doi:10.1186/s12885-017-3227-3
- Lee, D. H., Yoon, H., Park, S. *et al.*, (2018). Urinary Exosomal and cell-free DNA Detects Somatic Mutation and Copy Number Alteration in Urothelial Carcinoma of Bladder. *Sci Rep*, 8(1), 14707. doi:10.1038/s41598-018-32900-6
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. *et al.*, (1977). Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research*, 37(3), 646.
- Lorentz, C. A., Gilbert, K., Alemozaffar, M. *et al.*, (2018). Risk of Readmission After Uncomplicated Hospitalization After Radical Cystectomy. *Clin Genitourin Cancer*, 16(4), e705–e710. doi:10.1016/j.clgc.2018.01.004
- Lu, T., & Li, J. (2017). Clinical applications of urinary cell-free DNA in cancer: current insights and promising future. *American Journal of Cancer Research*, 7(11), 2318–2332.
- Machiela, M. J., Hofmann, J. N., Carreras-Torres, R. *et al.*, (2017). Genetic Variants Related to Longer Telomere Length are Associated with Increased Risk of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*, 72(5), 747–754. doi:10.1016/j.eururo.2017.07.015
- Magiorkinis, E., & Diamantis, A. (2015). The fascinating story of urine examination: From uroscopy to the era of microscopy and beyond. *Diagn Cytopathol*, 43(12), 1020–1036. doi:10.1002/dc.23370

- McConkey, D. J., Choi, W., Ochoa, A. *et al.*, (2016). Intrinsic subtypes and bladder cancer metastasis. *Asian J Urol*, 3(4), 260–267. doi:10.1016/j.ajur.2016.09.009
- Milowsky, M. I., Rumble, R. B., Booth, C. M. *et al.*, (2016). Guideline on Muscle-Invasive and Metastatic Bladder Cancer (European Association of Urology Guideline): American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement. *J Clin Oncol*, 34(16), 1945–1952. doi:10.1200/JCO.2015.65.9797
- Miyamoto, H., Miller, J. S., Fajardo, D. A. *et al.*, (2010). Non-invasive papillary urothelial neoplasms: the 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathol Int*, 60(1), 1–8. doi:10.1111/j.1440-1827.2009.02477.x
- Moschini, M., D'Andrea, D., Korn, S. *et al.*, (2017). Characteristics and clinical significance of histological variants of bladder cancer. *Nat Rev Urol*, 14(11), 651–668. doi:10.1038/nrurol.2017.125
- Mostafa, M. H., Sheweita, S. A., & O'Connor, P. J. (1999). Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 97–111.
- Mostofi, F. K. (1973). *Histological typing of urinary bladder tumours* / F. K. Mostofi, in collaboration with L. H. Sobin, H. Torloni, and pathologists in fourteen countries. Geneva: World Health Organization.
- Nagata, M., Muto, S., & Horie, S. (2016). Molecular Biomarkers in Bladder Cancer: Novel Potential Indicators of Prognosis and Treatment Outcomes. *Dis Markers*, 2016, 8205836. doi:10.1155/2016/8205836
- Park, H. S., Park, W. S., Bondaruk, J. *et al.*, Czerniak, B. (2008). Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst*, 100(19), 1401–1411. doi:10.1093/jnci/djn304
- Peyton, C. C., Tang, D., Reich, R. R. *et al.*, Gilbert, S. M. (2018). Downstaging and Survival Outcomes Associated With Neoadjuvant Chemotherapy Regimens Among Patients Treated With Cystectomy for Muscle-Invasive Bladder Cancer. *JAMA Oncol*, 4(11), 1535–1542. doi:10.1001/jamaoncol.2018.3542
- Pichler, R., Tulchiner, G., Oberaigner, W. *et al.*, (2017). Effect of Urinary Cytology for Detecting Recurrence in Remnant Urothelium After Radical Cystectomy: Insights From a 10-year Cytology Database. *Clin Genitourin Cancer*, 15(5), e783–e791. doi:10.1016/j.clgc.2017.03.003
- Pietzak, E. J., Zabor, E. C., Bagrodia, A. *et al.*, (2019). Genomic Differences Between "Primary" and "Secondary" Muscle-invasive Bladder Cancer as a Basis for Disparate Outcomes to Cisplatin-based Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol*, 75(2), 231–239. doi:10.1016/j.eururo.2018.09.002
- Ramlee, M. K., Wang, J., Toh, W. X. *et al.*, (2016). Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes (Basel)*, 7(8). doi:10.3390/genes7080050
- Rink, M., Schwarzenbach, H., Riethdorf, S. *et al.*, (2018). The current role and future directions of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol*. doi:10.1007/s00345-018-2543-9
- Russo, I. J., Ju, Y., Gordon, N. S. *et al.*, (2018). Toward Personalised Liquid Biopsies for Urothelial Carcinoma: Characterisation of ddPCR and Urinary cfDNA for the Detection of the TERT 228 G>A/T Mutation. *Bladder Cancer*, 4(1), 41–48. doi:10.3233/BLC-170152
- Ryan Mark, J., Gelpi-Hammerschmidt, F., Trabulsi, E. *et al.*, (2012). "Blue light" cystoscopy for detection and treatment of non-muscle invasive bladder cancer (Vol. 19).
- Salvi, S., Martignano, F., Molinari, C. *et al.*, (2016). The potential use of urine cell free DNA as a marker for cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 16(12), 1283–1290. doi:10.1080/14737159.2016.1254551
- Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A. *et al.*, (2017). Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17022. doi:10.1038/nrdp.2017.22
- Sapre, N., Anderson, P. D., Costello, A. J. *et al.*, (2014). Gene-based urinary biomarkers for bladder cancer: an unfulfilled promise? *Urol Oncol*, 32(1), 48 e49–17. doi:10.1016/j.urolonc.2013.07.002

- Shanks, J. H., & Iczkowski, K. A. (2009). Divergent differentiation in urothelial carcinoma and other bladder cancer subtypes with selected mimics. *Histopathology*, *54*(7), 885–900. doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03167.x
- Smith, A. B., Crowell, K., Woods, M. E. *et al.*, (2017). Functional Outcomes Following Radical Cystectomy in Women with Bladder Cancer: A Systematic Review. *Eur Urol Focus*, *3*(1), 136–143. doi:10.1016/j.euf.2016.05.005
- Smolensky, D., Rathore, K., & Cekanova, M. (2016). Molecular targets in urothelial cancer: detection, treatment, and animal models of bladder cancer. *Drug Des Devel Ther*, *10*, 3305–3322. doi:10.2147/DDDT.S112113
- Solsona, E., Iborra, I., Collado, A. *et al.*, (2010). Feasibility of radical transurethral resection as monotherapy for selected patients with muscle invasive bladder cancer. *J Urol*, *184*(2), 475–480. doi:10.1016/j.juro.2010.04.008
- Soubra, A., Gencturk, M., Froelich, J. *et al.*, (2018). FDG-PET/CT for Assessing the Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Bladder Cancer Patients. *Clin Genitourin Cancer*, *16*(5), 360–364. doi:10.1016/j.clgc.2018.05.008
- Sozzi, G., Conte, D., Leon, M. *et al.*, (2003). Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *21*(21), 3902–3908. doi:10.1200/JCO.2003.02.006
- Springer, S. U., Chen, C. H., Rodriguez Pena, M. D. C. *et al.*, (2018). Non-invasive detection of urothelial cancer through the analysis of driver gene mutations and aneuploidy. *Elife*, *7*. doi:10.7554/eLife.32143
- Stamm, A., Donahue, R., Dahl, K. *et al.*, (2018). Increasing Adherence to an AUA Guideline: A Durable Impact on Immediate Postoperative Mitomycin C Use. *Urology Practice*, *5*(6), 433–437. doi:10.1016/j.urpr.2017.11.002
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*, *5*(6), 463–466. doi:10.1097/COH.0b013e32833ed177
- Su, S. F., de Castro Abreu, A. L., Chihara, Y. *et al.*, (2014). A panel of three markers hyper- and hypomethylated in urine sediments accurately predicts bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res*, *20*(7), 1978–1989. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2637
- Sultana, S. R., Goodman, C. M., Byrne, D. J. *et al.*, (1996). Microscopic haematuria: urological investigation using a standard protocol. *British Journal of Urology*, *78*(5), 691–698. doi:10.1046/j.1464-410X.1996.01975.x
- Szarvas, T., Kovalszky, I., Bedi, K. *et al.*, (2007). *Deletion analysis of tumor and urinary DNA to detect bladder cancer: Urine supernatant versus urine sediment* (Vol. 18).
- Uzunlulu, M., Telci Caklili, O., & Oguz, A. (2016). Association between Metabolic Syndrome and Cancer. *Ann Nutr Metab*, *68*(3), 173–179. doi:10.1159/000443743
- Ward, D. G., & Bryan, R. T. (2017). Liquid biopsies for bladder cancer. *Transl Androl Urol*, *6*(2), 331–335. doi:10.21037/tau.2017.03.08
- Xylinas, E., Kluth, L. A., Lotan, Y. *et al.*, (2014). Blood- and tissue-based biomarkers for prediction of outcomes in urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*, *32*(3), 230–242. doi:10.1016/j.urolonc.2013.06.009
- Zancan, M., Franceschini, R., Mimmo, C. *et al.*, (2006). Free DNA in Urine: A New Marker for Bladder Cancer? Preliminary Data. *The Journal of Urology*, *175*(2), 787. doi:10.1016/S0022-5347(05)00445-3
- Zancan, M., Galdi, F., Di Tonno, F. *et al.*, (2009). *Evaluation of cell-free DNA in urine as a marker for bladder cancer diagnosis* (Vol. 24).
- Zhang, M. L., Rosenthal, D. L., & VandenBussche, C. J. (2016). The cytomorphological features of low-grade urothelial neoplasms vary by specimen type. *Cancer Cytopathol*, *124*(8), 552–564. doi:10.1002/cncy.21716
- Zhang, S., Yu, Y.-H., Zhang, Y. *et al.*, (2015). Radiotherapy in muscle-invasive bladder cancer: the latest research progress and clinical application. *American Journal of Cancer Research*, *5*(2), 854–868.

Zlotta, A. R., Fleshner, N. E., & Jewett, M. A. (2009). The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Canadian Urological Association Journal*, 3(6 Suppl 4), S199-S205.