

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

EFICÁCIA E APLICABILIDADE DOS BIOMARCADORES NO CANCRO DA BEXIGA

Liliana Vaz Simões

M

2019



Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

- Artigo de revisão bibliográfica

Título: EFICÁCIA E APLICABILIDADE DOS BIOMARCADORES NO CANCRO DA BEXIGA

Autor(a): Liliana Vaz Simões
Endereço eletrónico: lvazsimoes@gmail.com

Orientador: Dr. Manuel Antonielo Castanheira de Oliveira (Médico Especialista em Urologia;
Assistente Hospitalar de Urologia)
Endereço eletrónico: manuelantonielo@gmail.com

Co-Orientador: Professor Doutor Avelino Manuel Fraga Ferreira (Médico Especialista em
Urologia; Diretor de Serviço de Urologia)
Endereço eletrónico: afferreira@icbas.up.pt

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Rua de
Jorge Viterbo Ferreira nº 228, 4050-313 Porto

Junho 2019

A Autora:

Liliana Vaz Simões

(Liliana Vaz Simões)

O Orientador:

Manuel Antonelo Castanheira de Oliveira

(Manuel Antonelo Castanheira de Oliveira)

O Co-Orientador:

AMF

(Avelino Manuel Fraga Ferreira)

Porto, Junho de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Manuel Antonielo Castanheira de Oliveira, pela disponibilidade, dedicação e apoio na elaboração desta dissertação.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Avelino Manuel Fraga Ferreira, que fez meu o seu fascínio pela urologia.

A todos os que contribuíram e participaram nesta “montanha-russa” que é a vida académica.

O meu sincero agradecimento a todos!

RESUMO

Introdução: O cancro da bexiga é uma das neoplasias malignas mais prevalente no mundo e ao diagnóstico 75-80% dos doentes apresentam um cancro da bexiga não-músculo invasivo. Estes doentes necessitam de um *follow-up ad aeternum* porque mesmo após uma RTU com remoção tumoral completa, 50-70% têm recidiva tumoral e 10-30% progridem para um tumor músculo invasivo. O *gold-standard* para a deteção do cancro da bexiga é a cistoscopia, sendo também realizada como adjunto a citologia urinária. Impulsionados pela baixa sensibilidade da citologia urinária e pela morbidade e elevado ónus financeiro associados à cistoscopia, foram realizados diversos estudos com o objetivo de desenvolver um biomarcador com a mesma eficácia ou idealmente superior, que possa colmatar o das técnicas *standard*.

Objetivo: Revisão sobre os biomarcadores existentes para o cancro da bexiga assim como, a verificação das suas eficácias à luz dos estudos atuais na tentativa de se deprender a sua aplicabilidade na atualidade.

Metodologia: Pesquisa bibliográfica de artigos em língua inglesa dos últimos 24 anos, realizada nas bases de dados *Pubmed*, *ScienceDirect* e *Cochrane Libraries*. Redigida com base em artigos científicos originais e revisões bibliográficas. As palavras de pesquisa usadas foram uma combinação dos termos *bladder*, *cancer*, *biomarkers*, *diagnosis*, *surveillance* e *efficacy*.

Desenvolvimento: Os biomarcadores têm cinco possíveis funções primárias: o diagnóstico inicial de cancro da bexiga, com prioridade para doentes sintomáticos; o *follow-up* para a deteção de recidivas ou progressão da doença; a identificação de tumores não visíveis pela cistoscopia; a estratificação de risco para aferir probabilidade de recorrência e progressão; e a implementação de um rastreio populacional para o cancro da bexiga. De forma a fazer-se uma revisão sobre os biomarcadores existentes e aferir se as suas eficácias podem suplantar as das técnicas *standard* são descritos os seus papéis no diagnóstico inicial e no *follow-up* do cancro da bexiga. Foi dado ênfase aos biomarcadores já aprovados pela FDA, aos que não têm aprovação mas são atualmente comercializados e às promissoras descobertas recentemente publicadas.

Conclusão: Apesar de haver um grande número de biomarcadores promissores não existe nenhum que permita a comutação com as técnicas *standard* de diagnóstico na atualidade. No futuro é necessária uma validação por estudos multicêntricos prospetivos para concluir a sua verdadeira aplicabilidade. Atualmente, o seu papel continua a ser, meramente, um vislumbre de uma possível revolução futura no que concerne a esta assoberbante doença.

Palavras Chave: *Bladder; Cancer; Biomarkers; Diagnosis; Surveillance; Efficacy.*

ABSTRACT

Introduction: Bladder cancer is one of the most prevalent malignancies in the world and at diagnosis 75-80% of patients present non-muscle invasive bladder cancer. These patients require a follow-up *ad aeternum* because even after an TURP with complete tumor removal, 50-70% have tumor recurrence and 10-30% progress to an invasive muscle tumor. The gold-standard for the detection of bladder cancer is cystoscopy and is also performed as an adjunct to the urinary cytology. Driven by the low sensitivity of urinary cytology and by the morbidity and high financial burden associated with cystoscopy, several studies were carried out with the objective of developing a biomarker with the same or ideally superior biomarker that could meet the standard techniques.

Objective: Review of existing biomarkers for bladder cancer as well as the verification of their efficacy in the light of current studies in an attempt to understand its current applicability.

Methodology: Bibliographic research of articles in english of the last 24 years, carried out in *Pubmed*, *ScienceDirect* and *Cochrane Libraries* databases, written on the basis of original scientific articles and bibliographic reviews. The search words used were a combination of bladder, cancer, biomarkers, diagnosis, surveillance and efficacy.

Discussion: Biomarkers have five potential primary functions: the initial diagnosis of bladder cancer, with priority for symptomatic patients; follow-up for the detection of recurrences or disease progression; the identification of tumors not visible by cystoscopy; risk stratification to measure likelihood of recurrence and progression; and the implementation of population screening for bladder cancer. In order to review existing biomarkers and assess whether their efficacy can outperform standard techniques, their roles are described in the initial diagnosis and follow-up of bladder cancer. Emphasis was placed on the biomarkers already approved by the FDA, those not approved but currently marketed and promising findings recently published.

Conclusion: Although there are many promising biomarkers, there is no one that allows switching with standard diagnostic techniques today. In the future, a validation by prospective multicenter studies is required to conclude its true applicability. Today, its role remains merely a glimpse of a possible future revolution with regard to this overwhelming disease

Keywords: Bladder; Cancer; Biomarkers; Diagnosis; Surveillance; Efficacy.

LISTA DE ABREVIATURAS

CaB – Cancro da Bexiga
CU – Carcinoma Urotelial
TNM – Sistema de classificação de tumores malignos Tumor-Nódulo-Metástase
NMIBC – *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*
MIBC – *Muscle Invasive Bladder Cancer*
CIS – *Carcinoma in situ*
RTU – Resseção Transuretral
FDA – *Food and Drug Administration*
BTA – Bladder Tumor Antigen
NMP – *Nuclear Matrix Proteins*
NMP22 – *Nuclear Mitotic apparatus Protein*
EUA – Estados Unidos da América
U/mL – Unidades por mililitro
IGFBP5 – *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5*
HOXA13 – *Homeobox protein A13*
MDK – *Midkine*
CDK1 – *Cyclin Dependent Kinase 1*
CXCR2 – *Chemokine Receptor 2*
FP – Falsos positivos
FGFR3 – *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*
TERT – *Telomerase Reverse Transcriptase*
HRAS – *Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog*
OTX1 – *Orthodenticle Homeobox 1*
ONECUT2 – *One Cut domain family member 2*
TWIST1 – *Twist-related protein 1*
UPK1B – *Uroplakin 1B*
IGF2 – *Insulin-like Growth Factor 2*
CRH – *Corticotropin-Releasing Hormone*
ANXA10 – *Annexin A10*
ABL – *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
UBC – *Urinary bladder cancer*
VEs – Vesículas extracelulares
AURKA – *Aurora Kinase A*
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
HS3ST2 – *Heparan Sulfate-Glucosamine 3-Sulfotransferase 2*
PIK3CA – *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic subunit Alpha*
RAS – *Rat Sarcoma*
RB1 – *Retinoblastoma 1*
TSC1 – *Tuberous Sclerosis 1*
HER2 – *Human Epidermal growth factor Receptor 2*
PTEN – *Phosphatase and Tensin homolog*
APC – *Adenomatous Polyposis Coli*
RAR β – *Retinoic Acid Receptor Beta*
RASSF1 – *Ras association domain family member 1*
BRCA1 – *Breast Cancer 1*
SFRP – *Secreted Frizzled-Related Protein 1*
BCL2 – *B-Cell Lymphoma 2*
NID2 – *Nidogen 2*
SSRs – *Simple Sequence Repeats*
miRNAs – *MicroRNAs*
qRT-PCR – *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

CyPRIT – *Cytokine Panel for Response to Intravesical Therapy*
IL – *Interleukin*
VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*
CLAE – *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*
RMN – *Ressonância Magnética Nuclear*
BLCA1 – *Human Bladder Cancer Antigen 1*
BLCA4 – *Human Bladder Cancer Antigen 4*
ANG – *Angiopoietin*
APOE – *Apolipoprotein E*
CA9 – *Carbonic anhydrase 9*
MMP9 – *Matrix metalloproteinase 9*
MMP10 – *Matrix metalloproteinase 10*
SDC1 – *Syndecan 1*
SERPINA1 – *Serpin family A member 1*
SERPINE1 – *Serpin family E member 1*
VEGFA – *Vascular Endothelial Growth Factor A*
MCM5 – *Minichromosome Maintenance Complex Component 5*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	vii
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	4
METODOLOGIA.....	5
DESENVOLVIMENTO.....	6
Biomarcadores aprovados pela FDA	6
BTA	6
NMP22.....	7
ImmunoCyt™	8
UroVysion™	9
Biomarcadores comercialmente disponíveis (Não aprovados pela FDA)	11
Cxbladder™	11
Assure MDx™	12
XPert® Bladder Cancer Monitor	13
UBC®	13
Biomarcadores em investigação.....	14
Biomarcadores genómicos.....	14
Biomarcadores epigenéticos	15
Biomarcadores inflamatórios.....	17
Biomarcadores metabólicos.....	17
Biomarcadores proteicos.....	17
Vesículas extracelulares.....	18
CONCLUSÃO.....	20
BIBLIOGRAFIA	21
ANEXOS.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o marcador BTA.

Tabela II – Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o biomarcador NMP22.

Tabela III – Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o marcador uCyt+™.

Tabela IV – Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o marcador UroVysion™.

Tabela V – Comparação da eficácia diagnóstica do NMP22 test kit® e do BTA Stat®.

Tabela VI – Comparação da eficácia diagnóstica do ImmunoCyt™ e da UroVysion™.

Tabela VII – Sensibilidade e especificidade $\geq 80\%$ nos biomarcadores proteicos.

INTRODUÇÃO

Os câncros urológicos representam cerca de 25% de todos os câncros humanos,⁽¹⁾ sendo que o cancro da bexiga (CaB) é o 10º mais comum no mundo, sendo o 6º mais prevalente no sexo masculino e corresponde à 9ª causa de morte por neoplasia maligna mundialmente.⁽²⁾ É três a quatro vezes mais comum em homens⁽²⁾⁽³⁾ e afeta caucasianos cerca do dobro que etnias negra ou hispânica. Aquando do diagnóstico 90% dos doentes tem idades superiores a 55 anos.⁽³⁾ O envelhecimento da população e o sexo masculino são considerados os fatores de risco, não modificáveis, mais relacionados com a doença.⁽⁴⁾ O que se verifica na literatura é que a maioria dos tumores da bexiga estão associados a exposição carcinogénica adquirida e que a sua evicção pode diminuir significativamente a incidência da doença. O tabaco é assim considerado o principal fator de risco,⁽⁵⁾ aumentando-o 2.5 vezes,⁽⁶⁾ estimando-se que 50% dos casos de CaB, em ambos os sexos, sejam atribuídos ao seu consumo.⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾ A exposição a certas substâncias químicas foi também relacionada como importante para a carcinogénese, estimando-se que representa cerca de 10 a 20% de todos os casos.⁽¹⁰⁾⁽⁵⁾⁽¹¹⁾ A incidência a nível mundial de CaB parece refletir que as regiões com maior associação aos fatores de risco são aquelas que demonstram também uma maior incidência da doença,⁽¹⁰⁾ sendo assim concordante que os países desenvolvidos sejam os que tenham o maior número de casos diagnosticados.⁽²⁾⁽¹⁰⁾ De ressaltar que isto se deve também às diferenças em termos de sistema de saúde, protocolos e acesso a instalações de diagnóstico, justificando assim que em países com níveis de desenvolvimento de recursos superiores haja uma maior afluência da doença. Não obstante, de referir, que pela infeção de *Schistosoma haematobium*, fator de risco também comprovado, que em partes da zona geográfica do norte de África e subsariana, há um alto ónus da doença.⁽¹⁰⁾

O carcinoma urotelial (CU), anteriormente denominado como carcinoma de células de transição, é um tipo histológico de neoplasia que se origina em células epiteliais do urotélio.⁽¹²⁾ O urotélio é o revestimento epitelial do trato urinário, que se estende desde a pelve renal à uretra.⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ A esmagadora maioria de CU são CaB,⁽¹⁵⁾ contabilizando 90% dos casos.⁽¹²⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾ Histologicamente os CaB são categorizados como papilares e não papilares, tendo estas duas entidades vias de formação dispare, sendo assim patogenicamente diferentes. As lesões papilares originam-se por hiperplasia do urotélio e tendem a recidivarem após a sua excisão local, não tendo capacidade invasiva e, portanto, são classificadas como não músculo invasivas.⁽¹³⁾⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ A alteração genética mais associada é a mutação do FGFR-3.⁽¹⁵⁾ Por outro lado, as lesões não papilares, denominadas por alguns autores como lesões sólidas⁽¹³⁾ originam-se por displasia do urotélio tendo capacidade músculo invasiva⁽¹³⁾⁽¹⁷⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ e têm por base principal mutações que conduzem à inativação de supressores tumorais, principalmente o TP53 e o RB1.⁽¹⁵⁾ Apesar de serem duas vias com alterações genéticas específicas existem casos em que se verifica que há uma sobreposição de

ambas as características histológicas, o que veio a refletir a capacidade de progressão tumoral de tumores papilares para carcinomas invasivos.⁽¹⁷⁾ De enfatizar que a compreensão das propriedades patogénicas dos subtipos moleculares do CaB é ainda bastante limitada e controversa.⁽²²⁾

Para descrever a extensão da doença estes tumores são classificados segundo o sistema de estadiamento TNM (Tumor-Nódulo-Metástase)⁽¹¹⁾⁽¹⁹⁾ e histologicamente são classificados segundo graus.⁽¹¹⁾ Ao diagnóstico de CaB entre 75-80% dos doentes apresentam CaB não-músculo-invasivo (NMIBC)⁽⁴⁾⁽¹¹⁾⁽¹⁵⁾, ou seja, doença confinada à mucosa (Ta e Cis) ou lâmina própria (T1).⁽¹¹⁾ Os restantes apresentam-se com CaB músculo invasivo (MIBC) (T2-T4).⁽¹⁵⁾

O sintoma mais comum de apresentação clínica e mais correlacionado com o CaB⁽²³⁾ é a hematuria⁽³⁾⁽²⁴⁾, sendo que a hematuria macroscópica está associada a maior taxa de malignidade, de aproximadamente 20%⁽³⁾, comparativamente com 1.3% da microscópica, percentagens estimadas na ausência de patologia benigna suspeita.⁽³⁾⁽²⁴⁾ Infecções urinárias recorrentes e sintomas urinários são também sugestivos e frequentes à apresentação,⁽³⁾ sendo que os sintomas irritativos devem conjetar a possibilidade de um Carcinoma *in Situ* (CIS).⁽¹¹⁾

Atualmente, a técnica *gold-standard* para a deteção do CaB é a cistoscopia.⁽¹¹⁾ Além de estar longe de ser um exame exímio,⁽²⁵⁾ é ainda um procedimento operador-dependente, invasivo e com baixa sensibilidade para a deteção de tumores de baixo grau e para CIS, especialmente em casos de recidiva tumoral,⁽²⁶⁾ podendo passar despercebidos cerca de 10%.⁽²⁷⁾ A sensibilidade e especificidade da cistoscopia de luz branca são de 71% (95% IC 0.49-0.93%) e 72% (95% IC 47-96%), respetivamente.⁽²⁸⁾ Após a sua realização é frequente os doentes apresentarem disúria (50%), hematuria (19%) ou infeção urinária (3%).⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾ A citologia urinária apresenta uma elevada acuidade diagnóstica para lesões de alto grau e CIS, apresentando uma sensibilidade e especificidade entre 80-90% e 98-100% respetivamente,⁽³¹⁾ tendo também um importante papel na deteção de recorrências ao nível do urotélio superior, não detetáveis por cistoscopia. No entanto para a deteção de lesões de baixo grau é ineficiente⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾ tendo sensibilidades de 4-31%⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾ e apresenta uma alta taxa de falsos positivos decorrentes de patologias benignas e alterações causadas por quimioterapia ou radiação.⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾ Em estudos multicêntricos recentes a sua sensibilidade foi questionada, verificando-se ter valores inferiores do que os relatados anteriormente.⁽³⁹⁾

Os NMIBC, mesmo após uma resseção transuretral (RTU) com remoção completa do tumor, têm uma taxa de recorrência de aproximadamente 50-70% e 10 a 30% irão progredir no futuro para um MIBC,⁽⁴⁰⁾ necessitando de vigilância *ad aeternum*⁽²⁰⁾ com cistoscopia e citologia urinária com espaçamento mínimo de 3 meses,⁽¹¹⁾ e tratamentos repetidos ao longo das eventuais recidivas, tornando-se um cancro com elevadíssima morbidade⁽²⁰⁾ e o com o maior ônus por doente.⁽⁴¹⁾

Dado que apenas 10% dos doentes com hematuria que são submetidos a cistoscopia tem efetivamente um CaB, um teste não invasivo que conseguisse excluir a presença de doença minimizava a necessidade de utilização deste método invasivo.⁽⁴²⁾ Nos últimos anos tem-se aumentado a diligência para desenvolver adjuvantes à cistoscopia convencional para melhorar a

precisão diagnóstica e a detecção de recorrências, tanto com novas técnicas de cistoscopia,⁽¹¹⁾⁽²⁵⁾⁽⁴³⁾ como numa linha congénere na pesquisa de biomarcadores que possam revolucionar o diagnóstico, *follow-up* e até mesmo chegar a tornarem-se um método fiável e com perfil custo-benefício favorável para um *screening* da população de risco,⁽³⁸⁾ dado que apesar da elevada prevalência do CaB nenhuma organização major recomenda o seu rastreio em adultos assintomáticos.⁽¹¹⁾⁽³³⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾ Apesar de todas as lacunas, a citologia urinária é o biomarcador urinário mais utilizado, continuando assim a necessidade da descoberta de um biomarcador com quatro objetivos principais: diminuir a frequência da realização de exames invasivos, excluir a presença de recorrência da doença, detetar progressão no NMIBC e antever a resposta terapêutica.⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾

Um biomarcador é uma característica definida, objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos, processos patogénicos ou respostas a uma intervenção terapêutica.⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾ Pelo facto da urina contactar com todo o urotélio, incluindo o trato urinário superior, que não pode ser observado por cistoscopia, os biomarcadores urinários, pela sua fácil acessibilidade, possibilidade de colher quantidades suficientes de amostras e de repetir amostragens de forma não invasiva, seriam os que, à partida, aduziriam uma maior vantagem para o diagnóstico e *follow-up* do CU.⁽⁴⁶⁾⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾ Um biomarcador ideal seria barato, rápido, objetivo, fácil de interpretar e com alta sensibilidade e especificidade.⁽⁵²⁾

Os doentes com NMIBC de alto risco (pT1, CIS e tumores de alto grau) são os que fornecem o maior desafio, pela sua maior probabilidade de recidiva e progressão, necessitando de seguimento constante com técnicas invasivas.⁽⁵⁰⁾ Impulsionados pela baixa sensibilidade da citologia urinária e pela morbilidade associada à cistoscopia, foram realizados extensos estudos para desenvolver testes urinários para a detecção do CaB,⁽⁵³⁾ em que a sua maioria demonstrou ter uma maior sensibilidade do que a citologia urinária, mas uma menor especificidade.⁽¹¹⁾ Claramente, um teste não invasivo que tenha a mesma eficácia, ou idealmente superior à cistoscopia seria uma perspetiva muito atrativa, de forma a poder substituí-la ou melhorar a sua eficácia.⁽⁵⁴⁾

Na atualidade existem diversos estudos e diversas categorias de biomarcadores, sendo que seis deles foram aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para serem usados como adjuntos às técnicas *standard* no diagnóstico primário e no *follow-up*, mas a sua utilização não é ainda recomendada por nenhuma das guidelines internacionais.⁽¹¹⁾⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾ Os novos estudos têm como visão inicial a de suplantar em termos de eficácia diagnóstica as técnicas *standard* atuais, de forma a que pelo menos possam permitir espaçar por períodos de tempo mais alargados a necessidade de exames invasivos no *follow-up*. Sendo assim, os biomarcadores mostram-se como uma perspetiva tentadora na esperança do aumento da sensibilidade de detecção do CaB e na diminuição da morbilidade e custos da doença. Neste artigo de revisão são descritos os biomarcadores que existem na atualidade, assim como as novas investigações promissoras que estão a ser realizadas.

OBJETIVOS

O propósito da presente dissertação é a de mostrar o ponto de situação atual dos biomarcadores para o cancro da bexiga assim como, a verificação das suas eficácias à luz dos estudos atuais na tentativa de se depreender a sua aplicabilidade pelas recomendações da literatura especializada.

METODOLOGIA

A revisão bibliográfica foi redigida tendo por base artigos científicos originais e revisões bibliográficas escritas em língua inglesa, pesquisados nas bases de dados *Pubmed*, *ScienceDirect* e *Cochrane Libraries* (desde o ano 1995 até à atualidade).

Para a pesquisa foi utilizada a combinação das palavras-chave: *bladder*; *cancer*; *biomarkers*; *diagnosis*; *surveillance*; *efficacy*.

A seleção de artigos e exclusões teve por base o título e o *abstract* onde constasse informação sobre cancro da bexiga, diagnóstico e *follow-up* do cancro da bexiga, biomarcadores para o cancro da bexiga. Após a exclusão de artigos que não contemplassem no *abstract* o requerido para esta dissertação, selecionaram-se 244 artigos para a referência bibliográfica.

DESENVOLVIMENTO

Os biomarcadores têm cinco possíveis funções primárias: o diagnóstico inicial de CaB, com prioridade para doentes sintomáticos; o *follow-up* para a deteção de recidiva ou progressão da doença; a identificação de tumores não visíveis pela cistoscopia; a estratificação de risco para aferir probabilidade de recorrência e progressão; e a implementação de um rastreio populacional para o CaB. A descrição das suas duas características individuais mais relevantes, diagnóstico e *follow-up*, é descrita neste artigo na tentativa de fazer uma revisão sobre os biomarcadores existentes e aferir se as suas eficácias podem suplantar as das técnicas *standard* atuais. Foi dado ênfase aos biomarcadores já aprovados pela FDA, aos biomarcadores que apesar de não terem aprovação são atualmente comercializados e às promissoras descobertas atuais recentemente publicadas.

Biomarcadores aprovados pela FDA

Alguns dos testes comercializados foram aprovados pela FDA para uso como adjuvantes aos métodos *standard* para o diagnóstico e *follow-up* do CaB. Os testes aprovados pela FDA incluem o BTA, o NMP22, o ImmunoCyt™ e o UroVysion™.⁽¹⁸⁾

BTA

O antígeno do tumor da bexiga (BTA) é uma proteína relacionada com o fator H do complemento humano,⁽⁵⁷⁾ produzida por células malignas, conferindo uma vantagem à sobrevivência das células tumorais por interferir na cascata do complemento.

Existem duas versões do teste de BTA (*Polymedco Inc., Cortlandt Manor, New York, USA*) aprovados para o diagnóstico e *follow-up* de doentes com CaB, em uso concomitante com a cistoscopia, o BTA Trak® e o BTA Stat®. O primeiro é um teste quantitativo com necessidade de ser analisado em laboratório, necessitando de um processo de várias horas para se inferir um resultado, e o segundo é um teste qualitativo que pode ser analisado no consultório com uma duração máxima de 5 minutos.⁽⁵⁸⁾

Chou et al.⁽⁵⁹⁾ realizou a maior meta-análise até ao momento com um total de 22 estudos que verificou uma sensibilidade e especificidade de 64% (95% IC 0.58-0.69) e de 77% (95% IC 0.73-0.81) para o BTA Stat®. Demonstrou ainda que a sensibilidade era maior para o diagnóstico de doentes sintomáticos do que para a deteção de recorrência durante o *follow-up*, mas, que a especificidade era similar. Para o BTA Trak® a sensibilidade foi de 65% (95% IC 0.54-0.75) e a especificidade de 74% (95% IC 0.64-0.82) a partir da avaliação de 4 estudos (Tabela I). *Sathianathan et al.*⁽⁶⁰⁾ e *Lotan et al.*⁽³⁵⁾ realizaram também duas meta-análises tendo-se verificado resultados

semelhantes, com exceção da especificidade para o BTA Trak[®] aferida por *Lotan et al.* que se mostrou bastante superior à das restantes análises (90%), muito provavelmente por ter incluído na análise um número menor de estudos. A sensibilidade e especificidade foi também avaliada usando os dois testes de BTA em conjunto tendo obtido resultados de 49% e 86%, respetivamente.⁽³⁵⁾

Guo et al.⁽⁶¹⁾ realizou uma meta-análise com 13 estudos com o intuito de comparar a citologia urinária ao BTA Stat[®], tendo verificado uma sensibilidade de 43% (95% IC 0.40-0.46) e 67% (95% IC 0.64-0.69) e uma especificidade de 97% (95% IC 0.96-0.98) e 75% (95% IC 0.73-0.77), respetivamente.

Verificou-se que houve uma concordância entre a maioria dos resultados das meta-análises e que comparativamente à citologia urinária o BTA Stat[®] apresenta uma maior sensibilidade, mas uma especificidade significativamente menor. Pelos valores apresentados não tem eficácia suficientemente grande para poder substituir a citologia urinária. De referir, pela literatura, que patologias benignas, principalmente doentes que apresentem hematuria, conduzem a falsos positivos em ambos os testes.⁽⁶²⁾

NMP22

A matriz nuclear resulta da agregação de proteínas e tem um papel importante para a replicação de DNA, transcrição e *splicing* de RNA.⁽⁶³⁾ Tem na sua composição NMPs, *nuclear matrix proteins*, componentes essenciais para decorrer a mitose no núcleo das células eucarióticas e daí o seu papel fundamental na proliferação tumoral. Numerosas NMPs foram já descritas em tumores sólidos. Desta família faz parte a NMP22, *nuclear mitotic apparatus protein*,⁽⁵²⁾ que foi descrita como tendo um papel específico no desenvolvimento do CaB.⁽⁶⁴⁾ É eliminada por apoptose do núcleo das células para a urina, tendo sido descrita uma libertação 25 vezes superior em doentes com CaB relativamente à população em geral.⁽⁵²⁾⁽⁶⁵⁾ O seu uso como possível arma para a deteção do CaB é conhecido desde o final dos anos 90, depois de ter sido realizado um imunoensaio nos EUA.⁽⁵⁴⁾⁽⁶⁶⁾ Foram realizados dois testes para a deteção de NMP22 na urina, especificamente dirigidos para a deteção de CaB, o NMP22 BC test kit[®] e o NMP22 BladderChek test[®]. O ensaio quantitativo, NMP22 BC test kit[®] (*Matritech Inc.; Newton, MA, USA*), utiliza dois anticorpos e é aprovado pela FDA para o *follow-up* de doentes.⁽³⁵⁾ O NMP22 BladderChek test[®] (*Matritech Inc.; Newton, MA, USA*) é um ensaio imunocromático qualitativo e é aprovado pela FDA tanto para *follow-up* como para o diagnóstico inicial em doentes sintomáticos.⁽⁶⁷⁾⁽⁶⁸⁾ Ambos os testes demoram cerca de 30 minutos até à obtenção de um resultado, sendo facilmente usados na prática clínica diária.⁽⁶⁹⁾ Foram realizadas várias meta-análises para avaliar a sensibilidade e especificidades de ambos os testes.⁽⁷⁰⁾ *Chou et al.*⁽⁵⁹⁾ avaliou 19 estudos para o NMP22 BC test kit[®] e 4 estudos para o NMP22 BladderChek test[®]. Verificaram para o teste quantitativo uma sensibilidade e especificidade de 69% (95% IC 0.62-0.75) e 77% (95% IC 0.70-0.83) respetivamente, excluindo estudos com *cut-off* para positividade do

teste superior a 10U/mL. Para o teste qualitativo inferiu-se uma sensibilidade de 58% (95% IC 0.39-0.75) e uma especificidade de 88% (95% IC 0.78-0.94). Indagou-se ainda que a eficácia do NMP22 BC test kit[®] foi similar para o diagnóstico primário em doentes sintomáticos e em recorrências da doença durante o *follow-up*. Relativamente ao NMP22 BladderChek test[®] apesar de se verificar uma acuidade diagnóstica superior no *follow-up* de doentes, dado o pequeno número de estudos analisados esta avaliação fica limitada, assim como a avaliação da sua sensibilidade (tabela II). De outras 6 meta-análises⁽³⁵⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾ verificaram-se resultados similares, tendo o NMP22 BC test kit[®] apresentado sensibilidade entre 66 e 79% e uma especificidade entre os 77 e os 79%, e o NMP22 BladderChek test[®] apresentou sensibilidades entre 56 e 71% e especificidades entre 73% e 88%. *Mowatt et al.*⁽³²⁾ verificou ainda, a partir de 16 estudos, a sensibilidade e especificidade do NMP22 em comparação com a da citologia urinária, aferindo valores de 70% (95% IC 0.59-0.80) e 81% (95% IC 0.74-0.88) para o NMP22 e de 40% (95% IC 0.32-0.49) e de 97% (95% IC 0.95-0.99) para a citologia, respetivamente. A partir de outros 2 estudos verificou que quando usados em conjunto tinham uma sensibilidade de 91%. *Kumar et al.*⁽⁷⁴⁾ num estudo com 131 doentes comparou a eficácia na deteção de recidiva da doença durante o *follow-up* do NMP22 Bladder Chek test[®] (*cut-off* de 10 U/mL) com a citologia urinária, verificando sensibilidades de 85% e 78% e especificidades de 41% e 96%, respetivamente. Analisou também a sensibilidade para o uso em conjunto dos dois testes tendo se verificado o valor de 91%.

Grossman et al. realizou dois estudos⁽⁶⁷⁾⁽⁷⁵⁾ com um total de 1999 doentes que comparou a eficácia do NMP22 Bladder Chek test[®] (*cut-off* de 10 U/mL) à da cistoscopia. Verificou que a sensibilidade do NMP22 era de 50-56% e a da cistoscopia de 89-91%. Verificou ainda que quando usados concomitantemente obtinham uma sensibilidade diagnóstica de 94-99%.

Constata-se que o uso do NMP22 como substituto das técnicas *standard* diagnósticas do CaB não é exequível dado que apesar da sua sensibilidade superar a da citologia, a sua especificidade é significativamente inferior. Relativamente à cistoscopia verifica-se que quando usado em conjunto a sensibilidade diagnóstica supera a do uso isolado da técnica invasiva. No *Internation Bladder Cancer Update meeting em 2017* foi referido que se for obtido um resultado negativo com o NMP22 que a realização da cistoscopia podia ser protelada por um ano, em casos de tumor de baixo grau. Pelo facto de esta proteína ser libertada quando há morte celular estima-se que condições benignas conduzam a mais de 80% dos falsos-positivos atribuídos a este teste.⁽⁷⁶⁾

ImmunoCyt[™]

O teste ImmunoCyt[™]/uCyt+[™] (*Diagnocure Inc, Quebec, Canada*) foi desenvolvido no final dos anos 90⁽⁵⁴⁾ e usa a combinação da citologia e da imunofluorescência de anticorpos monoclonais para detetar 3 antígenos do CaB: M344, LDQ10 e 19A11, sendo positivo o teste quando pelo menos uma célula cora de verde ou vermelho fluorescente.⁽⁷⁷⁾ Para o resultado do teste ser positivo é

necessário um grande número de células esfoliativas, mais de 500 por lâmina. É um teste altamente dispendioso, com uma variação observador-dependente e com um longo período de tempo necessário para análise da amostra mas, dado ser um teste de base celular a influência de condições inflamatórias, mais especificamente de hematúria, revelou ser menor relativamente aos restantes testes.⁽⁷⁸⁾⁽⁷⁹⁾ Foi aprovado pelo FDA para o *follow-up* de doentes com história de CaB, só sendo recomendado o seu uso como um adjuvante à citologia urinária.⁽⁸⁰⁾

Chou et al.⁽⁵⁹⁾ realizou uma meta-análise de 14 estudos que apurou uma sensibilidade de 78% (95% IC 0.68-0.85) e uma especificidade de 78% (95% IC 0.72-0.82). Constatou ainda que a sensibilidade e especificidade era maior para o diagnóstico primário de doentes sintomáticos do que para o *follow-up* de doentes com história de CaB (Tabela III). Em outras meta-análises⁽³²⁾⁽⁶⁰⁾⁽⁸¹⁾ verificaram-se sensibilidades e especificidades superiores, com valores de 83-85% e de 75-87%, respetivamente.

Mowatt et al.⁽³²⁾ comparou, a partir de 6 estudos, o *uCyt+*TM com a citologia urinária tendo aferido uma sensibilidade de 82% (95% IC 0.76-0.89) e de 44% (95% IC 0.35-0.54) e uma especificidade de 85% (95% IC 0.71-0.85) e de 94% (95% IC 0.91-0.97), respetivamente. Verificou ainda que ambos quando usados em conjunto tinham uma sensibilidade de 87% e uma especificidade de 68%. *He et al.*⁽⁸¹⁾ realizou uma meta-análise similar constatando que os testes usados em conjunto apresentavam uma maior sensibilidade do que quando usados isoladamente mas, à custa da especificidade que se verificou ser muito inferior à da citologia isolada.

Schmitz-Dräger et al.⁽⁸²⁾ a partir de 280 doentes comparou a sensibilidade e especificidade do *uCyt+*TM à da cistoscopia, verificando uma sensibilidade e uma especificidade de 85% e 88% para a imunocitologia e de 84% e 98% para a cistoscopia. Quando usados concomitantemente de 100% e de 87% respetivamente, verificando-se uma sensibilidade perfeita, mas uma especificidade inferior ao do uso isolado da cistoscopia.

Comparando estas análises conclui-se que o *ImmunoCyt*TM tem uma especificidade inferior à da citologia urinária para a deteção de CaB. O seu uso concomitante com outras técnicas, apesar de levar a um aumento da sensibilidade, a especificidade notou-se sempre inferior ao do uso da cistoscopia ou da citologia isoladas.⁽⁸²⁾ *Pfister et al.*⁽⁸³⁾ alega que dada a elevada sensibilidade do *uCyt+*TM, o seu uso conjuntamente com a citologia urinária poderia protelar o uso de cistoscopia em maiores intervalos de tempo, em doentes com tumores de baixo risco.

UroVysionTM

A *UroVysion*TM é um técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH)⁽⁸⁰⁾ (*Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA*) concebida em 2000⁽⁸⁴⁾ para a deteção de CaB a partir de células uroteliais esfoliativas quanto à sua aneuploidia nos cromossomas 3, 7 e 13 e à perda do locus 9p21. Foi aprovado pelo FDA para o diagnóstico primário e *follow-up* de CaB.⁽⁸⁰⁾

Chou et al.⁽⁵⁹⁾ pela análise de 11 estudos verificou uma sensibilidade e especificidade para a detecção de CaB pela UroVysion™ de 63% (95% IC 0.50-0.75) e 87% (95% IC 0.79-0.93), respetivamente. Verificou ainda que o seu desempenho era superior para o diagnóstico primário de doentes sintomáticos do que para o *follow-up* de doentes com história de CaB mas, de referir que apenas um pequeno número de estudos foram incluídos para esta conclusão (Tabela IV). Noutra meta-análise,⁽³²⁾ com 12 estudos, aferiu-se uma sensibilidade de 76% (95% IC 0.65-0.84) e uma especificidade de 85% (95% IC 0.78-0.92). Para a detecção de tumores de baixo verificou-se que a sensibilidade da UroVysion™ foi baixa, semelhante à da citologia urinária.⁽⁸⁵⁾⁽⁸⁶⁾

Com a análise de 15 estudos aferiu-se a sensibilidade e especificidade do teste FISH e da citologia urinária, tendo-se obtido resultados para a UroVysion™ de 72% (95% IC 0.69-0.75) e 83% (95% IC 0.82-0.85) e para a citologia de 42% (95% IC 0.38-0.45) e de 96% (95% IC 0.95-0.97).⁽⁸⁵⁾ Quando usados em simultâneo foi reportada uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 50%.⁽⁸⁷⁾

Um estudo com 124 doentes analisou as eficácias do teste FISH e da cistoscopia. Verificou-se uma sensibilidade de 62% e de 67% e uma especificidade de 87% e de 85%, respetivamente. Quando usados em conjunto a sensibilidade foi superior (87%) mas a especificidade foi menor à do uso isolado das duas técnicas (79%).⁽³²⁾

O custo da UroVysion™ é maior do que o da citologia urinária e requer testes laboratoriais especializados, sendo portanto improvável que seja uma alternativa eficaz em termos de custo-benefício para as unidades que empregam citologia rotineiramente, mas verifica-se que pode ser útil nos casos de uma citologia atípica ou de uma cistoscopia equívoca, identificando doentes que precisarão de uma avaliação mais detalhada.⁽⁸⁸⁾⁽⁵⁶⁾ Dois estudos prospetivos verificaram que a UroVysion™ tem um alto valor preditivo positivo⁽⁸⁸⁾⁽⁸⁹⁾ e que doentes com positividade no teste e com cistoscopia negativa são mais propensos a terem uma recorrência da doença no espaço de um ano.⁽⁹⁰⁾

Assim, um teste FISH positivo pode ser empregue para antecipar a recorrência de CaB durante o *follow-up*, principalmente nos doentes de baixo risco.⁽⁸⁸⁾⁽⁸⁹⁾ Foi também verificado que durante o seguimento de doentes com história de CaB o uso do teste FISH após uma citologia atípica podia reduzir o número de biópsias indesejadas.⁽⁹¹⁾ Estes estudos sugerem assim, que aberrações cromossómicas são primárias ao aparecimento de lesões malignas detetáveis por cistoscopia ou por outros testes *strandard*.⁽⁹⁰⁾

Foram realizados poucos estudos com o objetivo de comparar diretamente a precisão dos biomarcadores. Em sete estudos⁽⁹²⁾⁽⁹³⁾⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁵⁾⁽⁹⁶⁾⁽⁹⁷⁾⁽⁹⁸⁾ não houve diferenças significativas na sensibilidade ou na especificidade entre o NMP22 test kit® (*cut-off* >10 U/mL) e o BTA Stat® e também, não se verificou diferenças significativas entre as suas precisões na detecção de CaB em diferentes estádios e graus de tumor (Tabela V).

Três estudos⁽⁹⁹⁾⁽¹⁰⁰⁾⁽⁹⁷⁾ verificaram que o ImmunoCyt™ tem uma maior sensibilidade para a detecção tumoral de estadios tumorais Ta e T1 e para baixo grau de CaB que a UroVysion™, mas menor especificidade (Tabela VI).

Apesar destes seis testes terem sido aprovados pela FDA para o seu uso em conjunto com as técnicas *standard* de diagnóstico e de seguimento de doentes com CaB, verificou-se que a maioria dos estudos têm populações caso-controle com uma prevalência altíssima da doença, o que conduz a um valor preditivo positivo irrealisticamente elevado. Para a sua aplicação no *follow-up* existe ainda a dificuldade de interpretação dos resultados positivos dos testes quando a cistoscopia se apresenta sem alterações detetáveis. Este problema reside no facto de que a maioria dos doentes após terem apresentado a positividade nos testes não foi submetido a uma biópsia confirmatória. Além disto existem escassas validações externas que apoiem a sua utilização na rotina da prática clínica. Em suma, são necessários estudos prospetivos multicêntricos que definam as consequências da positividade e negatividade destes testes a longo prazo, de forma a que as organizações internacionais possam advogar no sentido da sua utilidade ou não.

A questão que se coloca nesta altura é que se nem os biomarcadores aprovados pela FDA têm a precisão necessária para sua recomendação, porque falar de outros marcadores que nem sequer foram aprovados ou estão apenas em fases iniciais de investigação. A maioria dos testes referidos anteriormente cinge-se na análise de um biomarcador individual e os novos estudos estão a conduzir para uma abordagem diferente. Os novos biomarcadores estudados são testes com múltiplos marcadores, principalmente de DNA e RNA, focando-se em mutações específicas e, portanto, tornando-os à partida como uma melhor hipótese de se atingir a precisão necessária para a detecção do CaB.

Biomarcadores comercialmente disponíveis (Não aprovados pela FDA)

Apesar de não aprovados pela FDA quatro testes urinários estão comercialmente disponíveis. A sua comercialização é aceite porque foram desenvolvidos em laboratórios que apresentam os requisitos regulatórios da *Clinical Laboratory Improvement Amendments*.

Cxbladder™

O Cxbladder™ (*Pacific Edge Diagnostics, Dunedin, New Zealand*) é um teste que quantifica quatro mRNAs que são expressos no CaB: IGFBP5, HOXA13, MDK e CDK1, e o recetor CXCR2 que está associado a condições não malignas, com o intuito de reduzir os falsos-positivos (FP) decorrentes de condições inflamatórias.⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾ Existem três tipos de teste com diferentes alvos

populacionais do Cxbladder™: *Triage*, *Detect* e *Monitor*. O primeiro foi realizado com o intuito de triar a população sintomática para uma exclusão rápida de CaB, o *Detect* para o diagnóstico de doentes sintomáticos e o *Monitor* para o *follow-up* de doentes.⁽¹⁰³⁾

Breen et al.⁽¹⁰⁴⁾ aferiu uma sensibilidade para o Cxbladder™ *Detect* de 73.6% (95% IC 65.1-81.7) e uma especificidade de 81.7% (95% IC 0.787-0.844), e comparou-os com outros biomarcadores verificando que liderava com a sensibilidade mais alta mas, que a citologia continuava a dispor da especificidade mais elevada. Noutro estudo similar verificou-se um valor de especificidade semelhante mas uma sensibilidade superior, de 82% (95% IC 0.70-0.90).⁽¹⁰⁵⁾

Para o Cxbladder™ *Monitor* está descrito uma sensibilidade de 93% e para doentes de alto risco de 95% (95% IC 0.88-0.99).⁽¹⁰²⁾

Um estudo com 803 doentes comparou o Cxbladder™ *Monitor* com biomarcadores aprovados pela FDA, e verificou-se que a sua sensibilidade (91%) superava a da citologia (22%), a do NMP22 BC test kit® (26%) e a do NMP22 BladderChek® (11%). Concluíram ainda que com a sua utilização poderiam reduzir em 81.7% o número de cistoscopias de *follow-up*.⁽³⁹⁾

Os resultados tornam este biomarcador como muito promissor e apesar de serem necessários estudos prospetivos confirmatórios já há autores que advogam a sua utilização como um adjunto à cistoscopia alegando, que permite que sejam proteladas para espaços de tempo mais prolongados em doentes com baixo risco de recorrência.⁽⁴⁷⁾⁽³⁹⁾

Assure MDx™

O Assure MDx™ (*MDx Health, Irvine, California, USA*) é um teste urinário à base de DNA concebido para a deteção de CaB em doentes com hematuria, que identifica a mutação de três genes, FGFR3, TERT e HRAS, em combinação com a análise da metilação de outros três genes, OTX1, ONECUT2 e TWIST1.⁽¹⁰⁶⁾

Um estudo exploratório aferiu uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 83% para a deteção de CaB.⁽¹⁰⁶⁾ Estes resultados foram validados num estudo multicêntrico, demonstrando uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 86%.⁽¹⁰⁷⁾

O Assure Mdx™ é um teste promissor para doentes sintomáticos com hematuria que apresentem baixo risco de terem um CaB, por poder auxiliar na triagem de doentes, levando a uma potencial redução de 77% das cistoscopias diagnósticas desnecessárias. Porém é necessário a realização de estudos prospetivos para a sua validação.⁽¹⁰⁷⁾

XPert® Bladder Cancer Monitor

O XPert® *Bladder Cancer (BC) Monitor* (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) é um exame urinário baseado em mRNA, desenvolvido para o *follow-up* de doentes com CaB, que mede a expressão de cinco genes, UPK1B, IGF2, CRH, ANXA10 e ABL.⁽¹⁰⁸⁾

Pichler *et al.*⁽¹⁰⁸⁾ relataram recentemente as suas descobertas num estudo com 155 amostras de urina de 140 doentes com história de NMIBC durante o *follow-up*. Em comparação com a citologia mostrou-se superior em termos de sensibilidade (84% *versus* 33%), e enquanto à especificidade não diferiu de forma tão significativa (91% *versus* 94%). O teste XPert® *BC Monitor* apresentou sensibilidades superiores para a deteção de lesões de baixo grau (77%) e pTa (82%) em comparação com a citologia (13% e 21%, respetivamente). Num estudo com 230 doentes os resultados foram menos encorajadores, tendo-se verificado uma sensibilidade de 46.7% e uma especificidade de 77%.⁽¹⁰⁹⁾

As vantagens do teste estão relacionadas principalmente à sua rapidez, em que a preparação da amostra demora menos de 2 minutos e o tempo total de análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) cerca de 90 minutos.⁽¹⁰⁸⁾ Mas existe uma grande heterogeneidade entre os estudos e a sua falta de validação, com estudos prospetivos, torna a sua utilização limitada no momento.

UBC®

A UBC® (*Urinary bladder cancer*) é um teste urinário que deteta a expressão qualitativa ou quantitativa das citoqueratinas 8 e 18. O teste está disponível em dois formatos diferentes: UBC® -*ELISA* e UBC® -*rapid*. O primeiro é um teste quantitativo e o segundo qualitativo.

Foram relatadas para a UBC® -*rapid* sensibilidades de 86.9% para detetar CIS, 30.4% para NMIBC de baixo grau, 71.4% para NMIBC de alto grau e 60% para MIBC de alto grau.⁽¹¹⁰⁾ Outros quatro estudos⁽¹¹¹⁾⁽¹¹²⁾⁽¹¹³⁾⁽¹¹⁴⁾ aferiram uma sensibilidade para a UBC® -*rapid* que varia entre 30-87% em doentes com CIS e uma especificidade entre 63-91%.

Num estudo com 181 doentes em que 112 iam realizar RTU, 40 tinham realizado RTU no dia prévio, 10 eram mulheres com infeção do trato urinário baixo e 29 eram o grupo controle saudável, foram realizados os testes UBC® -*rapid*, UBC® -*ELISA* e citologia urinária. Foram aferidas sensibilidades de 64.4%, 46.6% e 70.5% e especificidades de 63.6%, 86.3% e 79.5%, respetivamente.⁽¹¹⁵⁾ Foi descrito que quando usados em simultâneo, a UBC® -*rapid* e a citologia, a sensibilidade aumentava para 77.4%, mas ao custo da diminuição da especificidade.⁽¹¹⁰⁾

A UBC® -*rapid* é um teste com resultados disponíveis rapidamente, em 10 minutos,⁽¹¹⁰⁾ no entanto comparativamente aos outros biomarcadores comerciais mostrou ser o que apresenta mais baixa especificidade.⁽¹¹⁴⁾ A sua utilidade clínica no futuro ainda precisa de ser determinada,

necessitando de estudos de validação, mas pelos resultados iniciais obtidos não se mostra tão promissora como os restantes biomarcadores.⁽¹¹⁰⁾

Biomarcadores em investigação

Pelo referido em cima, torna-se evidente que os biomarcadores para o diagnóstico primário e *follow-up* de doentes com história de CaB ainda permanece um desafio. Na tentativa de o contornar e com os avanços tecnológicos recentes estão a ser investigados diversos novos biomarcadores. No texto em baixo são discutidos os biomarcadores mais promissores e foram divididos por classes, genómicos, epigenéticos, inflamatórios, metabólicos, proteicos e vesículas extracelulares (VEs), de forma a serem sistematizados mais facilmente.

Biomarcadores genómicos

Muitas mutações genéticas têm sido relacionadas ao CaB e a análise genómica de mutações-alvo tem sido uma abordagem no desenvolvimento de novos biomarcadores.⁽⁶⁸⁾

O gene *Aurora Kinase A* (AURKA) é um importante regulador da mitose e é sobre-expresso por células cancerígenas.⁽¹¹⁶⁾⁽¹¹⁷⁾ Usando a técnica de FISH para identificar a sobre-expressão de AURKA Park *et al.*⁽¹¹⁶⁾ aferiu uma sensibilidade de 87% e uma especificidade de 96.6% para o diagnóstico de CaB. Para tumores de baixo grau o AURKA apresentou uma maior sensibilidade do que a citologia urinária (72.5% *versus* 59%).⁽¹¹⁸⁾ Com base nestes resultados, este biomarcador mostrou potencial para o diagnóstico de CaB, merecendo uma validação adicional com estudos multicêntricos prospetivos. Para o cenário de *follow-up* este biomarcador permanece inexplorado.⁽⁴⁶⁾

As mutações do recetor de crescimento do fibroblasto 3 (FGFR-3) estão presentes em cerca de 60-74% dos casos de NMIBC com estadio Ta.⁽¹¹⁹⁾⁽¹²⁰⁾⁽¹²¹⁾⁽¹²²⁾ Como a sua mutação parece identificar um subgrupo de doentes com melhor prognóstico, o FGFR-3 poderia ser um biomarcador não usado apenas para o *follow-up* mas também para a identificação de doentes de baixo risco de progressão da doença.⁽¹²¹⁾ Os resultados dos estudos ficam aquém do esperado, tendo mostrado sensibilidades e especificidades insuficientes e custos financeiros que ultrapassariam o dobro dos das técnicas *standard*. Verificou-se ainda com estes estudos que a sua eficácia para o MIBC era muito inferior, justificada por ser uma mutação típica do NMIBC.⁽¹²³⁾⁽¹²⁴⁾⁽¹²⁵⁾ Após estes resultados inesperados foram realizados painéis com outros biomarcadores (TERT; TERT e ORX1; HS3ST2, SEPTIN9 e SLIT2) na tentativa de se aprimorar o seu desempenho diagnóstico.⁽¹²⁶⁾⁽¹²⁷⁾⁽¹²⁸⁾⁽¹²⁹⁾ Os resultados foram apenas promissores com os marcadores de metilação do ADN (HS3ST2, SEPTIN9 e SLIT2), tendo-se verificado uma sensibilidade para deteção de recidiva tumoral de 94.5%.⁽¹²⁹⁾ É de ressalvar que se verificou que mesmo após resseção completa do tumor, 20.7% dos doentes

continuarão com um teste positivo para mutações do FGFR-3 e do TERT, apesar de nenhum tumor ser detectado por cistoscopia, durante o acompanhamento de três anos.⁽¹³⁰⁾ Estes resultados mostram que uma positividade para este marcador não permite evitar o uso da cistoscopia, tornando-o apenas útil quando usado em painel com outros biomarcadores para a estratificação de risco de doentes com NMIBC.⁽¹²³⁾⁽¹³¹⁾⁽¹³²⁾

Mutações nos genes TP53, PIK3CA, RAS, RB1, TSC1, HER2 e PTEN foram descritas como tendo um desempenho limitado pela sua baixa frequência e pela variabilidade entre tumores.⁽¹³³⁾⁽¹³⁰⁾⁽¹³³⁾

Está bem estabelecido que a acumulação de alterações genéticas constitui a base para o desenvolvimento tumoral, o chamado processo de carcinogénese,⁽¹⁹⁾ e que o NMIBC e o MIBC apresentam duas vias muito distintas. Avaliações prospetivas seriam assim de extrema importância para inferir mais sobre estes possíveis biomarcadores e caso se comprovassem seriam essenciais para prever perfis evolutivos tumorais e para a estratificação de riscos de progressão de doença.⁽¹³⁴⁾

Biomarcadores epigenéticos

As alterações epigenéticas são observadas frequentemente na maioria dos tumores,⁽¹³⁵⁾ e o fenómeno mais bem caracterizado e mais estudado para o CaB é a metilação do ADN. Embora o papel concreto que a metilação dos genes desempenha no CaB ainda não tenha sido bem estabelecido, existe alguma ânsia em saber se o status da metilação pode ser utilizado como assinatura diagnóstica para a deteção tumoral.⁽¹³⁶⁾⁽¹³⁷⁾⁽¹³⁸⁾

Metilação do ADN

Mais de 25 conjuntos de genes foram estudados para alterações da metilação de ADN com a finalidade de diagnóstico e *follow-up* de CaB. *Reinert et al.*⁽¹³⁹⁾ estudou seis genes e aferiu que para o *follow-up* as sensibilidades variam entre 82-89% e as especificidades entre 94-100%. Para o diagnóstico de recorrência durante o *follow-up* verificou sensibilidades entre 88-94% e especificidades entre 43-67%. Vários marcadores como o APC,⁽¹⁴⁰⁾⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁴²⁾⁽¹⁴³⁾⁽¹⁴⁴⁾ o RAR β ,⁽¹⁴⁴⁾⁽¹⁴⁵⁾⁽¹⁴⁶⁾⁽¹⁴⁷⁾ o RASSF1,⁽¹⁴⁰⁾⁽¹⁴²⁾⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁴⁹⁾⁽¹⁵⁰⁾ a E-caderina,⁽¹⁴⁵⁾⁽¹⁴⁸⁾⁽¹⁵¹⁾ o BRCA1,⁽¹⁴⁹⁾⁽¹⁴⁶⁾ o SFRP,⁽¹⁵²⁾⁽¹⁴²⁾⁽¹⁵³⁾ a TERT⁽¹⁵⁴⁾⁽¹⁵⁵⁾⁽¹⁴³⁾ e a BCL2⁽¹⁵⁴⁾⁽¹⁴⁹⁾⁽¹⁵⁵⁾ demonstraram uma elevada sensibilidade em múltiplos estudos, necessitando de validações independentes com estudos prospetivos. *Renard et al.*⁽¹⁵⁶⁾ relataram resultados da metilação urinária de dois genes, TWIST1 e NID2, que ofereciam uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 93% para o diagnóstico de CU e que a sua precisão era superior no diagnóstico primário.⁽¹⁵⁷⁾ No estudo de validação realizado posteriormente reportou-se uma sensibilidade e especificidade significativamente inferior, de 79% e 63%, respetivamente.⁽¹⁵⁸⁾

Su et al.⁽¹⁵⁹⁾ verificaram, com a junção de três marcadores, dois hipermetilados e um hipometilado, que havia previsão da recorrência de doença em 80% dos casos, o que se mostrou ser superior à da citologia (35%) e à da cistoscopia (15%). Foi também desenvolvido um teste muito promissor de marcadores epigenéticos, o UroMark, que aferiu uma sensibilidade e especificidade para o diagnóstico primário de CaB de 98% e 97%, respectivamente.⁽¹⁶⁰⁾

Microssatélites

O genoma é densamente povoado por microssatélites (SSRs-*Simple Sequence Repeats*) que são constituídos por um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*, possuem um grande polimorfismo decorrente das altas taxas de mutações nesses loci e são agentes que podem ser usados para a detecção da carcinogênese.⁽¹⁶¹⁾ A sua análise tem como alvo as repetições em *tandem* de forma a detetar a perda de heterozigotia que ocorre com a transformação tumoral. Vários estudos demonstraram que essas alterações de microssatélites podem ser analisadas a partir de amostras de urina para a detecção de CaB,⁽¹⁶²⁾⁽¹⁶³⁾⁽¹⁶⁴⁾⁽¹⁶⁵⁾⁽¹⁶⁶⁾⁽¹⁶⁷⁾⁽¹⁶⁸⁾⁽¹⁶⁹⁾ mostrando terem uma maior sensibilidade que a citologia urinária, especialmente para tumores de baixo grau.⁽¹⁶²⁾⁽¹⁶⁹⁾⁽¹⁶³⁾ Os estudos apresentam conclusões contrastantes e a sua falta de validação não tornam possível tirar conclusões sobre a sua utilidade.⁽¹⁶⁷⁾

MicroRNAs

Os MicroRNAs (miRNAs) têm sido investigados como biomarcadores para vários tumores por serem reguladores de processos epigenéticos, exibindo uma expressão específica em tecidos e por terem um papel central na carcinogênese.⁽¹⁷⁰⁾ O conhecimento de que os miRNAs são estáveis, mesmo na fração livre de células em fluídos corporais, torna o seu perfil urinário uma nova via para o desenvolvimento de biomarcadores, formando uma assinatura específica de miRNA. Até ao momento, a maioria dos estudos utilizou o qRT-PCR para medir o perfil dos miRNAs,⁽¹⁷¹⁾⁽¹⁷²⁾⁽¹⁷³⁾⁽¹⁷⁴⁾⁽¹⁷⁵⁾⁽¹⁷⁶⁾⁽¹⁷⁷⁾ tendo-se aferido sensibilidades e especificidades bastante variantes entre estudos. Verificou-se pelo isolamento dois miRNAs (miR-125b e miR-126) com uma sensibilidade e especificidade para a detecção primária de CaB de 80% e de 100%, respectivamente.⁽¹⁷⁷⁾ Realizaram, simultaneamente, citologias urinárias aos mesmos doentes tendo-se verificado uma capacidade diagnóstica inferior, com sensibilidade de 50% e especificidade de 80%. Verificou-se que o grupo controle entre estudos foi muito heterogéneo, tendo muitos deles englobando doentes com patologias benignas, o que prevê a possibilidade de que os miRNAs possam ser responsivos a alterações inflamatórias e infecciosas.⁽¹⁷¹⁾⁽¹⁷⁴⁾⁽¹⁷⁵⁾⁽¹⁷⁶⁾

Embora a especificidade dos marcadores epigenéticos seja muito atrativa e que certos autores afirmem que com o seu uso é possível minimizar a frequência de cistoscopias de *follow-up*,⁽¹⁵⁹⁾ as

técnicas de genética molecular são bastante dispendiosas, demoradas e com necessidade de profissionais altamente especializados, o que torna os testes de marcadores de metilação como testes clínicos de rotina sem custo-benefício na atualidade.

Biomarcadores inflamatórios

Kamat et al.⁽¹⁷⁸⁾ verificou a alteração ao nível de nove citocinas (IL-6, IL-1ra, IL-2, IL-8, IL-12 (p70), IL-18, IFN- γ , TNF- α e TRAIL) que foram incorporadas num nomograma para prever a resposta à terapia intravesical (CyPRIT), que previu a probabilidade de recorrência de doença com 85.5% de precisão (95% IC 77.9-93.1%). O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), a IL-8 e a IL-6 foram correlacionadas com o estadió da doença.⁽¹⁷⁹⁾⁽¹⁸⁰⁾⁽¹⁸¹⁾⁽¹⁸²⁾

Dado que a angiogénese e os processos inflamatórios são eventos inespecíficos, com sobreposição de patologias benignas, a precisão para deteção de CaB torna-se limitada.

Biomarcadores metabólicos

Alterações ao nível dos metabolitos podem ser detetados em fluídos biológicos, como a urina, podendo detetar a assinatura biológica de células cancerígenas antes do aparecimento de sintomas clínicos. O CaB tem características metabólicas específicas que podem ser analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com espectrofotometria de massa e por ressonância magnética nuclear (RMN).⁽¹⁸³⁾ *Cheng et al.*⁽¹⁸⁴⁾ avaliaram um conjunto de metabolitos urinários como biomarcadores para o NMIBC aferindo uma sensibilidade para a sua deteção de 88.1% e uma especificidade de 78.6%. De outros estudos realizados aferiram-se sensibilidades até 100%,⁽¹⁸⁵⁾⁽¹⁸⁶⁾ sendo necessário prudência na sua avaliação por não serem estudos validados.

Biomarcadores proteicos

Numerosos estudos testaram a utilidade de várias proteínas que foram previamente relacionadas com o CaB, tendo sido testados biomarcadores de forma isolada e em combinação, tendo havido ultimamente uma maior tendência para biomarcadores usados em combinação.⁽¹⁸⁷⁾ As mudanças fenotípicas só se podem manifestar através da expressão proteica alterada, de modo que a identificação de fatores proteicos envolvidos no CaB pode elucidar a biologia tumoral, e a identificação de perfis proteicos urinários têm vindo a demonstrar-se como promissores.⁽¹⁸⁸⁾⁽¹⁸⁹⁾⁽¹⁹⁰⁾ Apesar de várias proteínas já terem sido analisadas, mostraram uma grande variabilidade de eficácia⁽¹⁹¹⁾ no entanto, existe um número selecionado de biomarcadores que parecem contrariar esta tendência. Dos estudos que avaliaram o uso de biomarcadores individuais 14 relataram sensibilidade e especificidades superiores a 80% (Tabela VII).⁽¹⁹²⁾⁽¹⁹³⁾⁽¹⁹⁴⁾⁽¹⁹⁵⁾⁽¹⁹⁶⁾⁽¹⁹⁷⁾⁽¹⁹⁸⁾⁽¹⁹⁹⁾⁽²⁰⁰⁾⁽²⁰¹⁾⁽²⁰²⁾⁽²⁰³⁾⁽²⁰⁴⁾

A BLCA-1 e a BLCA-4 demonstraram uma elevada expressão no início do desenvolvimento do CaB, em particular a BLCA-4 que parece ser seletivamente expressa por células tumorais da bexiga, tendo verificado uma sensibilidade e especificidade para a deteção de CaB de 89-96% e de 90-100% respetivamente,⁽²⁰⁵⁾⁽²⁰⁶⁾⁽²⁰⁷⁾⁽²⁰⁸⁾ enquanto que para o BLCA-1 uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 87%.⁽²⁰⁹⁾ Apesar de se mostrarem como biomarcadores promissores necessitam de validação adicional para a sua recomendação e utilização como adjuvantes de diagnóstico tumoral.⁽²¹⁰⁾

Rosser et al.⁽¹⁹¹⁾ com a avaliação de um conjunto de dez biomarcadores (ANG, APOE, CA9, IL-8, MMP9, MMP10, SDC1, SERPINA1, SERPINE1 e VEGFA) aferiram uma sensibilidade e especificidade para detetar recorrência de doença de 79% e de 88%, respetivamente.

As proteínas de manutenção, MCM, são produzidas por células em proliferação e desempenham um papel crítico na replicação do ADN.⁽²¹¹⁾⁽²¹²⁾ Foi realizado um teste para a deteção primária de CaB com o MCM5, o ADXBLADDER™, em doentes que apresentam hematuria, tendo sido apresentado por *Dudderisge et al.*⁽²¹³⁾ no Congresso da Associação Europeia de Urologia em 2018 um estudo multicêntrico prospetivo tendo-se verificado uma sensibilidade de 76% (95% IC 61.23%-87.41%) e uma especificidade de 95% (95% IC 75.13%-99.87%) para NMIBC de alto risco. Para MIBC foi aferida uma especificidade de 69% (95% IC 65.06-73.08%). Verificou-se ainda que o ADXBLADDER™ detetou 8 em 10 tumores comparativamente a 2 em 10 detetados pela citologia urinária, sendo que todos os tumores detetados pela citologia foram detetados pelo ADXBLADDER™.

Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são vesículas de membrana que são libertadas por células para a região extracelular circundante e são divididas em três grupos, corpos apoptóticos, microvesículas e exossomas.⁽²¹⁴⁾ As VEs estão presentes nos fluídos corporais, como a saliva,⁽²¹⁵⁾ o sangue,⁽²¹⁶⁾⁽²¹⁷⁾ o leite materno⁽²¹⁸⁾ e a urina.⁽²¹⁹⁾⁽²²⁰⁾ O seu conteúdo consiste em material genético, proteínas e lípidos.⁽²²¹⁾⁽²²²⁾ Recentemente concluiu-se que o contacto entre as células tumorais e os tecidos circulantes desempenha um papel crucial na progressão tumoral⁽²²³⁾ e que as VEs estão envolvidas nesse processo por reprogramarem o microambiente tumoral ao influenciarem diferentes células do sistema imunológico, gerando um ambiente propício para a invasão tumoral.⁽²²⁴⁾⁽²²⁵⁾ Pela sua função na biologia tumoral, a sua origem, o seu conteúdo e a facilidade de acesso a fluídos corporais, as VEs são uma fonte promissora de biomarcadores.⁽²²⁶⁾⁽²²⁷⁾

A sua pesquisa para o diagnóstico e *follow-up* do CaB é extensa e muitos potenciais biomarcadores são descritos na literatura, nomeadamente proteicos⁽²²⁸⁾⁽²²⁹⁾⁽²³⁰⁾⁽²³¹⁾⁽²³²⁾⁽²³³⁾⁽²³⁴⁾⁽²³⁵⁾⁽²²⁹⁾ e genéticos.⁽²³⁶⁾⁽²³⁷⁾⁽²³⁸⁾⁽²³⁹⁾⁽²⁴⁰⁾⁽²⁴¹⁾⁽²⁴²⁾

A caracterização da carga de VEs das populações de doentes e controlos saudáveis pode além de conduzir ao desenvolvimento de biomarcadores que possam substituir as técnicas *standard* utilizadas no CaB, levar a um conhecimento mais aprofundado da biologia tumoral. Apesar destas potenciais descobertas, mais pesquisas são necessárias para validar a sua utilidade clínica.⁽²¹⁴⁾ Dos estudos já realizados existem limitações aos seus resultados por serem constituídos por análises heterogêneas e com população reduzida.⁽²³¹⁾⁽²⁴⁰⁾

CONCLUSÃO

O CaB constitui um problema sério e emergente de Saúde Pública mundialmente, constituindo uma doença associada a uma elevada morbidade e ónus económico. O envelhecimento populacional e a continuação de exposição a fatores de risco têm conduzido à perpetuação da sua incidência. Dado o grande encargo da doença, para o doente e para o sistema nacional de saúde, novas técnicas que permitam uma deteção idónea da doença poderiam conduzir ao remodelamento dos métodos vigentes de diagnóstico. É uma doença desafiadora em que o conhecimento à cerca da sua biologia ainda se mantém aquém da de outros tumores sólidos, e os mecanismos dispares na origem do NMIBC e do MIBC dificulta a missão de descoberta de novos métodos diagnósticos.

Neste artigo de revisão foram descritos os principais e mais promissores biomarcadores. Apesar da sua maioria apresentar sensibilidade superior à da citologia urinária, estão longe de ser exímios para a suplantar, facto pelo qual nenhuma das organizações internacionais os recomenda nas suas *guidelines*. Resultados promissores têm surgido dos novos estudos apresentados, principalmente no que concerne à deteção de assinaturas genéticas tumorais. A longo prazo podem fornecer além da precisão necessária para a deteção do CaB, uma visão sobre os perfis mutacionais dos tumores e conduzir a terapêuticas dirigidas, como ocorre já em outros tumores sólidos, mas conclusões sobre a sua aplicabilidade são ainda prematuras. Pela escassez de estudos que analisem dentro de uma mesma população os diferentes marcadores, a sua comparação direta torna-se enviesada e de difícil execução.

Conclui-se com este artigo de revisão, após uma vasta pesquisa bibliográfica, que apesar de haver um grande número de biomarcadores promissores, não existe nenhum que permita a comutação com as técnicas *standard* de diagnóstico. No futuro o investimento na sua validação por estudos multicêntricos prospetivos devia tornar-se uma prioridade para se concluir a sua verdadeira aplicabilidade. Atualmente, o seu papel continua a ser, meramente, um vislumbre de uma possível revolução futura no que concerne a esta assoberbante doença.

BIBLIOGRAFIA

1. Mlcochova H, Hezova R, Stanik M, Slaby O. Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2014;32(1):41.e1-41.e9.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
3. DeGeorge K, Holt H, Hodges S. Bladder cancer: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2017;96(8):507–14.
4. Care P. Bladder cancer: Diagnosis and management of bladder cancer. *BJU Int.* 2017;120(6):755–65.
5. Burger M, Catto J, Dalbagni G, et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. 2013;63:234–41.
6. Cumberbatch M, Rota M, Catto J, Vecchia C. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis. *Eur Urol.* 2016;70(3):458-66.
7. Park S, Jee S, Shin H, et al. Attributable fraction of tobacco smoking on cancer using population-based nationwide cancer incidence and mortality data in Korea. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1–12.
8. Freedman N. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *Jama.* 2011;306(7):737.
9. Agudo A, Bonet C, Travier N, et al. Impact of cigarette smoking on cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4550–7.
10. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol.* 2017;71(1):96–108.
11. Babjuk M, Böhle A, Burger M, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol.* 2017;71(3):447–61.
12. Miyazaki J, Nishiyama H. Epidemiology of urothelial carcinoma. *Int J Urol.* 2017;24(10):730–4.
13. Czerniak B. Origins of bladder cancer. *Lab Investig.* 2016;88(7):686–93.
14. Dinney C, McConkey D, Millikan R, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell.* 2004;6(2):111–6.
15. Maffezzini M, Campodonico F. Bladder cancer. *ESMO Handbook Cancer Sr Patient.* 2010;388:121–7.
16. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7–34.
17. Martin-Doyle W, Kwiatkowski D. Molecular biology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015;29(2):191–203.
18. Goodison S, Rosser C, Urquidi V. Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine- and blood-based marker tests. *Mol Diagnosis Ther.* 2013;17(2):71–84.
19. Knowles M, Hurst C. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(1):25–41.
20. Choi W, Ochoa A, McConkey D, et al. Genetic alterations in the molecular subtypes of bladder cancer: illustration in the cancer genome atlas dataset. *Eur Urol.* 2017;72(3):354–65.
21. Spiess P, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(6):844–52.
22. Batavia J, Yamany T, Molotkov A, et al. Bladder cancers arise from distinct urothelial subpopulations. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):982–91.
23. Rodriguez R, Rueda O, Ibarz L. Bladder cancer: present and future. *Med Clin (Barc).* 2017;149(10):449–55.
24. Davis R, Jones J, Barocas D, et al. Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline. *J Urol.* 2012;188(6 SUPPL.):2473–81.
25. Jochem D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic diagnosis in urology: State of the art. *Eur Urol.* 2008;53(6):1138–1150.

26. Raitanen M, Leppilahti M, Tuhkanen K, et al. Routine follow-up cystoscopy in detection of recurrence in patients being monitored for bladder cancer. *Ann Chir Gynaecol*. 2001;90(4):261–5.
27. Lam T, Nabi G. Potential of urinary biomarkers in early bladder cancer diagnosis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007;7(8):1105–15.
28. Mowatt G, N'Dow J, Vale L, et al. Photodynamic diagnosis of bladder cancer compared with white light cystoscopy: systematic review and meta-analysis. 2011;27(1):3–10.
29. Biarreau X, Lam O, Ba V, Campeau L, Corcos J. Prospective evaluation of anxiety, pain, and embarrassment associated with cystoscopy and urodynamic testing in clinical practice. *J Can Urol Assoc*. 2017;11(3-4):104–10.
30. Burke D, Shackley D, O'Reilly P. The community-based morbidity of flexible cystoscopy. *BJU Int*. 2002;89(4):347–9.
31. Grégoire M, Fradet Y, Meyer F, et al. Diagnostic accuracy of urinary cytology, and deoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washings during follow up for bladder tumors. *J Urol*. 1997;157(5):1660–4.
32. Mowatt G, Zhu S, Kilonzo M, et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of photodynamic diagnosis and urine biomarkers (FISH, ImmunoCyt, NMP22) and cytology for the detection and follow-up of bladder cancer. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2010;14(4):1–331.
33. Clark P, Agarwal N, Biagioli M, et al. Bladder cancer: clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2013;11(4):446–75.
34. Têtu B. Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod Pathol*. 2009;22(S2):S53–S59.
35. Lotan Y, Roehrborn C. Sensitivity and specificity of commonly available bladder tumor markers versus cytology: results of a comprehensive literature review and meta-analyses. *Urology*. 2003;61(1):109–18.
36. Karakiewicz P, Benayoun S, Zippe C, et al. Institutional variability in the accuracy of urinary cytology for predicting recurrence of transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int*. 2006;97(5):997–1001.
37. Witjes J, Compérat E, Cowan N, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: Summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol*. 2014;65(4):778–92.
38. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, De La Taille A, Benson M, Sawczuk I. Current concepts in biomarker technology for bladder cancers. *Clin Chem*. 2000;46(5):595–605.
39. Lotan Y, O'Sullivan P, Raman J, et al. Clinical comparison of noninvasive urine tests for ruling out recurrent urothelial carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2017;35(8):531.e15-531.e22.
40. Sugano K, Kakizoe T. Genetic alterations in bladder cancer and their clinical applications in molecular tumor staging. *Nat Clin Pract Urol*. 2006;3(12):642–52.
41. Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, Witjes J. Economic burden of bladder cancer across the European Union. *Eur Urol*. 2016;69(3):438–47.
42. Kelly J, Fawcett D, Goldberg L. Assessment and management of non-visible haematuria in primary care. *BMJ*. 2009;338:a3021
43. Bryan R, Billingham L, Wallace D. Narrow-band imaging flexible cystoscopy in the detection of recurrent urothelial cancer of the bladder. *BJU Int*. 2008;101(6):702–5.
44. American Cancer Society; Can Bladder Cancer Be Found Early? Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/detection-diagnosis-staging/detection.html>. Consultado pela última vez: 2019/02/13
45. Bellmunt J, Orsola A, Leow J, Wiegel T, De Santis M, Horwich A. Bladder cancer: ESMO Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25(suppl 3):iii40–8.
46. Sapre N, Anderson P, Costello A, Hovens C, Corcoran N. Gene-based urinary biomarkers for bladder cancer: An unfulfilled promise? *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2014;32(1):48.e9-48.e17.
47. Soria F, Droller M, Lotan Y, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. *World J Urol*. 2018;36(12):1981–95.
48. Califf R. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 2018;243(3):213–21.
49. Atkinson A, Colburn W, DeGruttola V, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.

50. Noon A, Zlotta A. Urothelial Bladder Cancer Urinary Biomarkers. *Ejifcc* [Internet]. 2014;25(1):99–114.
51. Urquidi V, Rosser C, Goodison S. Molecular diagnostic trends in urological cancers. 2013;19(22):3653–63.
52. Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2008;2(3):212–21.
53. Shim J, Kang S. Surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer. *Bladder cancer*. Elsevier Inc.; 2018;pp: 541–551.
54. Leiblich A. Recent developments in the search for urinary biomarkers in bladder cancer. *Curr Urol Rep*. 2017;18(12):100.
55. Chang S, Boorjian S, Chou R, et al. Diagnosis and treatment of non-muscle invasive bladder cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol*. 2016;196(4):1021–9.
56. Kamat A, Hegarty P, Gee J, et al. ICUD-EAU international consultation on bladder cancer 2012: Screening, diagnosis, and molecular markers. *Eur Urol*. 2013;63(1):4–15.
57. Cheng Z, Corey M, Pärepaló M, et al. Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer. *Clin Chem*. 2005;51(5):856–63.
58. Malkowicz S. The application of human complement factor H-related protein (BTA TRAK) in monitoring patients with bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 2000;27(1):63–73.
59. Chou R, Gore J, Buckley D, Fu R, et al. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer. *Ann Intern Med*. 2015;163(12):922.
60. Sathianathen N, Butaney M, Weight C, Kumar R, Konety B. Urinary biomarkers in the evaluation of primary hematuria: a systematic review and meta-analysis. *Bladder Cancer*. 2018;4(4):353–363.
61. Guo A, Wang X, Gao L, Shi J, Sun C, Wan Z. Bladder tumour antigen (BTA stat) test compared to the urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: A meta-analysis. *J Can Urol Assoc*. 2014;8(5–6):E347-52.
62. Lokeshwar V, Habuchi T, Grossman H, et al. Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers. *Urology*. 2005;66(6 SUPPL. 1):35–63.
63. He D, Zeng C, Brinkley B. Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus. *Int Rev Cytol*. 1996;162(PB):1–74.
64. Soloway M, Briggman J, Carpinito G, et al. Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J Urol*. 1996;156:363-7.
65. Jamshidian H, Kor K, Djalali M. Urine concentration of nuclear matrix protein 22 for diagnosis of transitional cell carcinoma of bladder. *Urol J*. 2008;5(4):243–7.
66. Miyanaga N, Akaza H, Tsukamoto T, et al. Urinary nuclear matrix protein 22 as a new marker for the screening of urothelial cancer in patients with microscopic hematuria. *Int J Urol*. 1999;6(4):173–7.
67. Grossman H, Soloway M, Messing E, et al. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *J Am Med Assoc*. 2006;295(3):299–305.
68. Tabayoyong W, Kamat A. Current use and promise of urinary markers for urothelial cancer. *Curr Urol Rep*. 2018;19(12):96.
69. Duquesne I, Weisbach L, Aziz A, Kluth L, Xylinas E. The contemporary role and impact of urine-based biomarkers in bladder cancer. *Transl Androl Urol*. 2017;6(6):1031–42.
70. Schmitz-Dräger B, Droller M, Lokeshwar V, et al. Molecular markers for bladder cancer screening, early diagnosis, and surveillance: The WHO/ICUD consensus. *Urol Int*. 2015;94(1):1–24.
71. Liang Q, Zhang G, Li W, Wang J, Sheng S. Comparison of the diagnostic performance of fluorescence in situ hybridization (Fish), nuclear matrix protein 22 (nmp22), and their combination model in bladder carcinoma detection: a systematic review and meta-analysis. *Oncotargets Ther*. 2019;12:349–58.
72. Wang Z, Que H, Suo C, et al. Evaluation of the NMP22 BladderChek test for detecting bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(59):100648–56.
73. Rhijn B, Poel H, Kwast T. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. *Eur Urol*. 2005;47(6):736–48.

74. Kumar A, Kumar R, Gupta N. Comparison of NMP22 BladderChek test and urine cytology for the detection of recurrent bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2006;36(3):172–5.
75. Grossman H, Messing E, Soloway M, et al. Detection of bladder cancer using a proteomic assay. *Jama*. 2005;293(20):2466–7.
76. Agarwal A. Exclusion criteria enhance the specificity and positive. 1999;162(1):53–7.
77. Greene K, Berry A, Konety B. ImmunoCyt / uCyt+ Test in bladder cancer. *Rev Urol*. 2006;8(4):190–7.
78. Hautmann S, Toma M, Gomez M, et al. Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer: a side-by-side comparison. *Eur Urol*. 2004;46(4):466–71.
79. Todenhöfer T, Hennenlotter J, Tews V, et al. Impact of different grades of microscopic hematuria on the performance of urine-based markers for the detection of urothelial carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2013;31(7):1148–54.
80. Gonzalgo M, Darwiche F, Parekh D. Biomarkers for non-muscle invasive bladder cancer: current tests and future promise. *Indian J Urol*. 2015;31(4):273.
81. He H, Han C, Hao L, Zang G. ImmunoCyt test compared to cytology in the diagnosis of bladder cancer: a meta-analysis. *Oncol Lett*. 2016;12(1):83–8.
82. Schmitz-Dräger B, Tirsar L, Schmitz-Dräger C, et al. Immunocytology in the assessment of patients with asymptomatic hematuria. *World J Urol*. 2008;26(1):31–7.
83. Pfister C, Chautard D, Devonec M, et al. Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology: results of a French multicenter study. *J Urol*. 2003;169(3):921–4.
84. Sokolova I, Halling K, Jenkins R, et al. The development of a multitarget, multicolor fluorescence in situ hybridization assay for the detection of urothelial carcinoma in Urine. *J Mol Diagnostics*. 2000;2(3):116–23.
85. Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2008;26(6):646–51.
86. Dimashkieh H, Wolff D, Smith T, Houser P, Nietert P, Yang J. Evaluation of urovysion and cytology for bladder cancer detection. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(10):591–7.
87. Daniely M, Rona R, Kaplan T, et al. Combined morphologic and fluorescence in situ hybridization analysis of voided urine samples for the detection and follow-up of bladder cancer in patients with benign urine cytology. *Cancer*. 2007;111(6):517–24.
88. Schlomer B, Ho R, Sagalowsky A, Ashfaq R, Lotan Y. Prospective validation of the clinical usefulness of reflex fluorescence in situ hybridization assay in patients with atypical cytology for the detection of urothelial carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2010;183(1):62–7.
89. Seideman C, Canter D, Kim P, et al. Multicenter evaluation of the role of UroVysion FISH assay in surveillance of patients with bladder cancer: does FISH positivity anticipate recurrence? *World J Urol*. 2015;33(9):1309–13.
90. Moonen P, Merckx G, Peelen P, Karthaus H, Smeets D, Witjes J. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2007;51(5):1275–80.
91. Kim P, Sukhu R, Cordon B, et al. Reflex fluorescence in situ hybridization assay for suspicious urinary cytology in patients with bladder cancer with negative surveillance cystoscopy. *BJU Int*. 2014;114(3):354–9.
92. Friedrich M, Hellstern A, Hautmann S, et al. Clinical use of urinary markers for the detection and prognosis of bladder carcinoma: A comparison of immunocytology with monoclonal antibodies against Lewis X and 486p3/12 with the BTA Stat and NMP22 tests. *J Urol*. 2002;168(2):470–4.
93. Baños J, Rodrigo M, Juárez F, García B. NMP 22, BTA stat test and cytology in the diagnosis of bladder cancer: a comparative study. *Urol Int*. 2001;66(4):185–90.
94. Saad A, Hanbury D, McNicholas T, Boustead G, Morgan S, Woodman A. A study comparing various noninvasive methods of detecting bladder cancer in urine. *BJU Int*. 2002;89(4):369–73.
95. Sharma S, Zippe C, Pandrangi L, Nelson D, Agarwal A. Exclusion criteria enhance the specificity and positive predictive value of NMP22 and BTA stat. *J Urol*. 1999;162(1):53–7.

96. Serretta V, Pomara G, Rizzo I, Esposito E. Urinary BTA-stat, BTA- trak and NMP22 in surveillance after TUR of recurrent superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 2000;38(4):419–25.
97. Toma M, Friedrich M, Hautmann S, et al. Comparison of the ImmunoCyt test and urinary cytology with other urine tests in the detection and surveillance of bladder cancer. *World J Urol.* 2004;22(2):145–9.
98. Wiener H, Mian C, Haitel A, Pycha A, Schatzl G, Marberger M. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer? *J Urol.* 1998;159(6):1876–80.
99. Horstmann M, Patschan O, Hennenlotter J, Senger E, Feil G, Stenzl A. Combinations of urine-based tumour markers in bladder cancer surveillance. *Scand J Urol Nephrol.* 2009;43(6):461–6.
100. Sullivan P, Nooraie F, Sanchez H, et al. Comparison of ImmunoCyt, UroVysion, and urine cytology in detection of recurrent urothelial carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2009;117(3):167–73.
101. Holyoake A, O’Sullivan P, Pollock R, et al. Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res.* 2008;14(3):742–9.
102. Kavalieris L, O’Sullivan P, Frampton C, et al. Performance characteristics of a multigene urine biomarker test for monitoring for recurrent urothelial carcinoma in a multicenter study. *J Urol.* 2017;197(6):1419–26.
103. Cxbladder - non-invasive urine test for bladder cancer. Disponível em: <https://www.cxbladder.com/us/>. Consultado pela última vez: 2019/05/02
104. Breen V, Kasabov N, Kamat A, et al. A holistic comparative analysis of diagnostic tests for urothelial carcinoma: a study of Cxbladder Detect, UroVysion® FISH, NMP22® and cytology based on imputation of multiple datasets Data analysis, statistics and modelling. *BMC Med Res Methodol.* 2015;15(1):1–12.
105. O’Sullivan P, Sharples K, Dalphin M, et al. A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria. *J Urol.* 2012;188(3):741–7.
106. Kessel K, Neste L, Lurkin I, Zwarthoff E, Van Criekinge W. Evaluation of an epigenetic profile for the detection of bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol.* 2016;195(3):601–7.
107. Kessel K, Beukers W, Lurkin I, Ziel-van A, et al. Validation of a DNA methylation-mutation urine assay to select patients with hematuria for cystoscopy. *J Urol.* 2017;197(3 Part 1):590–595.
108. Pichler R, Fritz J, Tulchiner G, et al. Increased accuracy of a novel mRNA-based urine test for bladder cancer surveillance. *BJU Int.* 2018;121(1):29–37.
109. Delia C, Pycha A, Folchini D, et al. Diagnostic predictive value of Xpert Bladder Cancer Monitor in the follow-up of patients affected by non-muscle invasive bladder cancer. *J Clin Pathol.* 2019;72(2):140–4.
110. Pichler R, Tulchiner G, Fritz J, Schaefer G, Horninger W, Heidegger I. Urinary UBC rapid and NMP22 test for bladder cancer surveillance in comparison to urinary cytology: Results from a prospective single-center study. *Int J Med Sci.* 2017;14(9):811–9.
111. Ecke T, Arndt C, Stephan C, et al. Preliminary results of a multicentre study of the UBC Rapid Test for detection of urinary bladder cancer. *Anticancer Res.* 2015;35(5):2651–5.
112. Ecke T, Weiß S, Stephan C, et al. UBC® rapid test for detection of carcinoma in situ for bladder cancer. *Tumor Biol.* 2017;39(5):1010428317701624.
113. Styrke J, Henriksson H, Ljungberg B, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of UBC® Rapid in bladder cancer: a Swedish multicentre study. *Scand J Urol.* 2017;51(4):293–300.
114. Ritter R, Hennenlotter J, Kühs U, et al. Evaluation of a new quantitative point-of-care test platform for urine-based detection of bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2014;32(3):337–44.
115. Hakenberg O, Fuessel S, Richter K, et al. Qualitative and quantitative assessment of urinary cytokeratin 8 and 18 fragments compared with voided urine cytology in diagnosis of bladder carcinoma. *Urology.* 2004;64(6):1121–6.
116. Park H, Park W, Bondaruk J, et al. Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(19):1401–11.

117. Zhou N, Singh K, Mir M, et al. The investigational aurora kinase A inhibitor MLN8237 induces defects in cell viability and cell-cycle progression in malignant bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2013;19(7):1717–28.
118. Martino M, Shariat S, Hofbauer S, et al. Aurora A Kinase as a diagnostic urinary marker for urothelial bladder cancer. *World J Urol.* 2014;33(1):105–10.
119. Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton M, et al. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(6):1955–9.
120. Rhijn B, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels W, Kwast T, Zwarthoff E. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res.* 2001;61(4):1265–8.
121. Miyake M, Sugano K, Sugino H, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation in voided urine is a useful diagnostic marker and significant indicator of tumor recurrence in non-muscle invasive bladder cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(1):250–8.
122. Knowles M. Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World J Urol.* 2007;25(6):581–93.
123. Zuiverloon T, Aa M, Kwast T, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 mutation analysis on voided urine for surveillance of patients with low-grade non-muscle - Invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(11):3011–8.
124. Zuiverloon T, Beukers W, Keur K, et al. Combinations of urinary biomarkers for surveillance of patients with incident nonmuscle invasive bladder cancer: the European FP7 UROMOL project. *J Urol.* 2013;189(5):1945–51.
125. Kessel K, Kompier L, Bekker-Grob E, et al. FGFR3 mutation analysis in voided urine samples to decrease cystoscopies and cost in nonmuscle invasive bladder cancer surveillance: A comparison of 3 strategies. *J Urol.* 2013;189(5):1676–81.
126. Allory Y, Beukers W, Sagrera A, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: High frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur Urol.* 2014;65(2):360–6.
127. Beukers W, Van A, Kandimalla R, et al. *FGFR3*, *TERT* and *OTX1* as a urinary biomarker combination for surveillance of patients with bladder cancer in a large prospective multicenter study. *J Urol.* 2017;197(6):1410–1418.
128. Kandimalla R, Masius R, Beukers W, et al. A 3-plex methylation assay combined with the FGFR3 mutation assay sensitively detects recurrent bladder cancer in voided urine. *Clin Cancer Res.* 2013;19(17):4760–9.
129. Roperch J, Grandchamp B, Desgrandchamps F, et al. Promoter hypermethylation of HS3ST2, SEPTIN9 and SLIT2 combined with FGFR3 mutations as a sensitive/specific urinary assay for diagnosis and surveillance in patients with low or high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *BMC Cance.* 2016;16(1):1–9.
130. Critelli R, Fasanelli F, Oderda M, et al. Detection of multiple mutations in urinary exfoliated cells from male bladder cancer patients at diagnosis and during follow-up. *Oncotarget.* 2016;7(41).
131. Bangma C, Loeb S, Zhu X, El B, et al. 447 Outcomes of a european bladder cancer screening program using home hematuria testing and molecular markers. *Eur Urol Suppl.* 2012;11(1):e447-e447a.
132. Oers J, Lurkin I, Exsel A, Nijsen Y, et al. A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine. *Clin Cancer Res.* 2005;11(21):7743–8.
133. Ward D, Baxter L, Gordon N, et al. Multiplex PCR and Next generation sequencing for the non-invasive detection of bladder cancer. *PLoS One.* 2016;11(2):1–11.
134. Nagata M, Muto S, Horie S. Molecular biomarkers in bladder cancer: Novel Potential Indicators of Prognosis and Treatment Outcomes. *Dis Markers.* 2016;2016:1–5.
135. Esteller M. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2009;31(1):27–36.
136. Chung W, Bondaruk J, Jelinek J, et al. Detection of bladder cancer using novel DNA methylation biomarkers in urine sediments. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(7):1483–91.

137. Reinert T, Modin C, Castano F, et al. Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: Identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers. *Clin Cancer Res.* 2011;17(17):5582–92.
138. Kandimalla R, Tilborg A, Zwarthoff E. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2013;10(6):327–35.
139. Reinert T, Borre M, Christiansen A, Hermann G, Ørntoft T, Dyrskjøt L. Diagnosis of Bladder Cancer Recurrence Based on Urinary Levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 Hypermethylation. *PLoS One.* 2012;7(10):1–9.
140. Dulaimi E, Uzzo R, Greenberg R, Al-Saleem, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1887–93.
141. Pu R, Laitala L, Clark D. Methylation profiling of urothelial carcinoma in bladder biopsy and urine. *Acta Cytol.* 2006;50(5):499–506.
142. Serizawa R, Ralfkiær U, Steven K, et al. Integrated genetic and epigenetic analysis of bladder cancer reveals an additive diagnostic value of FGFR3 mutations and hypermethylation events. *Int J Cancer.* 2011;129(1):78–87.
143. Zuiverloon T, Beukers W, Keur K, et al. A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine. *BJU Int.* 2012;109(6):941–8.
144. Berrada N, Amzazi S, Ameziane R, et al. Epigenetic alterations of adenomatous polyposis coli (APC), retinoic acid receptor beta (RAR β) and survivin genes in tumor tissues and voided urine of bladder cancer patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2012;Suppl.58:OL1744–51.
145. Chan M, Chan L, Tang N, et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002;8(2):464–70.
146. Cabello M, Grau L, Franco N, et al. Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes in bladder cancer. *J Mol Diagnostics.* 2011;13(1):29–40.
147. Eissa S, Zohny S, Shehata H, Hegazy M, Salem A, Esmat M. Urinary retinoic acid receptor- β 2 gene promoter methylation and hyaluronidase activity as noninvasive tests for diagnosis of bladder cancer. *Clin Biochem.* 2012;45(6):402–7.
148. Yates D, Rehman I, Meuth M, Cross S, Hamdy F, Catto J. Methylational urinalysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene.* 2006;25(13):1984–8.
149. Yu J, Zhu T, Wang Z, et al. A novel set of DNA methylation markers in urine sediments for sensitive/specific detection of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(24):7296–304.
150. Chan M, Chan L, Tang N, et al. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer.* 2003;104(5):611–6.
151. Lin H, Ke H, Huang S, Wu W, Chen Y, Chang L. Increase sensitivity in detecting superficial, low grade bladder cancer by combination analysis of hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, RASSF1A genes in urine. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2010;28(6):597–602.
152. Urakami S, Shiina H, Enokida H, et al. Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2006;12(7 Part 1):2109–16.
153. Chen P, Tsai M, Yip S, et al. Distinct DNA methylation epigenotypes in bladder cancer from different Chinese sub-populations and its implication in cancer detection using voided urine. *BMC Med Genomics.* 2011;4(PG-45):45.
154. Friedrich M, Weisenberger D, Cheng J, et al. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7457–65.
155. Vinci S, Giannarini G, Selli C, et al. Quantitative methylation analysis of BCL2, hTERT, and DAPK promoters in urine sediment for the detection of non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: a prospective, two-center validation study. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2011;29(2):150–6.
156. Renard I, Joniau S, Cleynebreugel B, et al. Identification and validation of the methylated TWIST1 and NID2 genes through real-time methylation-specific polymerase chain reaction assays for the noninvasive detection of primary bladder cancer in urine samples. *Eur Urol.* 2010;58(1):96–104.

157. Fantony J, Abern M, Gopalakrishna A, et al. Multi-institutional external validation of urinary TWIST1 and NID2 methylation as a diagnostic test for bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2015;33(9):387.e1-387.e6.
158. Abern M, Owusu R, Inman B. Clinical performance and utility of a DNA methylation urine test for bladder cancer¹¹This study was funded, in part, by MDxHealth (formerly OncoMethlyome Sciences). *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2014;32(1):51.e21-51.e26.
159. Su S, Abreu A, Chihara Y, et al. A panel of three markers hyper- and hypomethylated in urine sediments accurately predicts bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1978–89.
160. Feber A, Dhami P, Dong L, et al. UroMark - a urinary biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Clin Epigenetics.* 2017;9(1):1–10.
161. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet.* 2004;5(6):435–45.
162. Seripa D, Parrela P, Gallucci M, et al. Sensitive detection of transitional cell carcinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. *Int J Cancer.* 2001;95(6):364–9.
163. Frigerio S, Padberg B, Strebel R, et al. Improved detection of bladder carcinoma cells in voided urine by standardized microsatellite analysis. *Int J Cancer.* 2007;121(2):329–38.
164. Hoque M, Lee J, Begum S, et al. High-throughput molecular analysis of urine sediment for the detection of bladder cancer by high-density single-nucleotide polymorphism array. *Cancer Res.* 2003;63(18):5723–6.
165. Bekker-Grob E, Aa M, Zwarthoff E, et al. Non-muscle-invasive bladder cancer surveillance for which cystoscopy is partly replaced by microsatellite analysis of urine: a cost-effective alternative? *BJU Int.* 2009;104(1):41–7.
166. vAa M, Zwarthoff E, Steyerberg E, et al. Microsatellite analysis of voided-urine samples for surveillance of low-grade non-muscle-invasive urothelial carcinoma: feasibility and clinical utility in a prospective multicenter study (Cost-effectiveness of follow-up of urinary bladder cancer trial). *Eur Urol.* 2009;55(3):659–68.
167. Coenen M, Ploeg M, Schijvenaars M, et al. Allelic imbalance analysis using a single-nucleotide polymorphism microarray for the detection of bladder cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2008;14(24):8198–204.
168. Wild P, Fuchs T, Stoehr R, et al. Detection of urothelial bladder cancer cells in voided urine can be improved by a combination of cytology and standardized microsatellite analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(6):1798–806.
169. Steiner G, Schoenberg M, Linn J, Mao L, Sidransky D. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. *Nat Med.* 1997;3(6):621–4.
170. Bartel D. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
171. Hanke M, Hoefig K, Merz H, et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2010;28(6):655–61.
172. Puerta-Gil P, Garca-Baquero R, Jia A, et al. MiR-143, miR-222, and miR-452 are useful as tumor stratification and noninvasive diagnostic biomarkers for bladder cancer. *Am J Pathol.* 2012;180(5):1808–15.
173. Yamada Y, Enokida H, Kojima S, et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: Correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci.* 2011;102(3):522–9.
174. Wang G, Chan E, Kwan B, et al. Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2012;10(2):106–13.
175. Yun S, Jeong P, Kim W, et al. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. *Int J Oncol.* 2012;41(5):1871–8.
176. Miah S, Dudzic E, Drayton R, et al. An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer. *Br J Cancer.* 2012;107(1):123–8.
177. Snowdon J, Boag S, Feilotter H, Izard J, Siemens D. A pilot study of urinary microRNA as a biomarker for urothelial cancer. *J Can Urol Assoc.* 2013;7(2):28–32.

178. Kamat A, Briggman J, Urbauer D, et al. Cytokine panel for response to intravesical therapy (CyPRIT): nomogram of changes in urinary cytokine levels predicts patient response to Bacillus Calmette-Guérin. *Eur Urol*. 2016;69(2):197–200.
179. Sankhwar M, Sankhwar S, Abhishek A, Rajender S. Clinical significance of the VEGF level in urinary bladder carcinoma. *Cancer Biomarkers*. 2015;15(4):349–55.
180. Sheryka E, Wheeler M, Hausladen D, Weiss R. Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell carcinoma. *Urology*. 2003;62(1):162–6.
181. Rigaud J, Leger A, Devilder M, Bouchot O, Bonneville M, Scotet E. Development of predictive value of urinary cytokine profile induced during intravesical Bacillus Calmette-Guérin instillations for bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2015;13(4):e209–15.
182. Cai T, Nesi G, Mazzoli S, et al. Prediction of response to bacillus calmette-Guérin treatment in non-muscle invasive bladder cancer patients through interleukin-6 and interleukin-10 ratio. *Exp Ther Med*. 2012;4(3):459–64.
183. Hyndman M, Mullins J, Bivalacqua T. Metabolomics and bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2011;29(5):558–61.
184. Cheng X, Liu X, Liu X, et al. Metabolomics of Non-muscle Invasive Bladder Cancer: Biomarkers for Early Detection of Bladder Cancer. *Front Oncol*. 2018;8:494.
185. Issaq H, Nativ O, Waybright T, et al. Detection of bladder cancer in human urine by metabolomic profiling using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Urol*. 2008;179(6):2422–6.
186. Pasikanti K, Esuvaranathan K, Ho P, et al. Noninvasive urinary metabonomic diagnosis of human bladder cancer. *J Proteome Res*. 2010;9(6):2988–95.
187. Kelly J, Dudderidge T, Wollenschlaeger A, et al. Bladder cancer diagnosis and identification of clinically significant disease by combined urinary detection of MCM5 and nuclear matrix protein 22. *PLoS One*. 2012;7(7):1–9.
188. Rosser C, Urquidi V, Goodison S. Urinary biomarkers of bladder cancer: an update and future perspectives. *Biomark Med*. 2013;7(5):779–90.
189. Majewski T, Spiess P, Bondaruk J, et al. Detection of bladder cancer using proteomic profiling of urine sediments. *PLoS One*. 2012;7(8):e42452.
190. Lindén M, Lind S, Mayrhofer C, et al. Proteomic analysis of urinary biomarker candidates for nonmuscle invasive bladder cancer. *Proteomics*. 2012;12(1):135–44.
191. Rosser C, Chang M, Dai Y, et al. Urinary protein biomarker panel for the detection of recurrent bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(7):1340–5.
192. Srivastava A, Singh P, Srivastava K, et al. Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(1):81–5.
193. Lorenzi T, Lorenzi M, Altobelli E, et al. HtrA1 in human urothelial bladder cancer: A secreted protein and a potential novel biomarker. *Int J Cancer*. 2013;133(11):2650–61.
194. El-Hakim T, El-Shafie M, Abdou A, Azmy R, El-Naidany S, El-Din M. Value of urinary survivin as a diagnostic marker in bladder cancer. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*. Junho de 2014;36(3):121–7.
195. Li C, Li H, Zhang T, Li J, Liu L, Chang J. Discovery of Apo-A1 as a potential bladder cancer biomarker by urine proteomics and analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(4):1047–52.
196. Jamshidian H, Hashemi M, Nowroozi M, Ayati M, Bonyadi M, Najjaran Tousi V. Sensitivity and specificity of urinary hyaluronic acid and hyaluronidase in detection of bladder transitional cell carcinoma. *Urol J*. 2014;11(1):1232–7.
197. Rosser C, Dai Y, Miyake M, Zhang G, Goodison S. Simultaneous multi-analyte urinary protein assay for bladder cancer detection. *BMC Biotechnol*. 2014;14(1):24.
198. Inoue K, Ota U, Ishizuka M, et al. Porphyrins as urinary biomarkers for bladder cancer after 5-aminolevulinic acid (ALA) administration: The potential of photodynamic screening for tumors. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10(4):484–9.
199. Attallah A, El-Far M, Abdallah S, El-Waseef A, et al. Combined use of epithelial membrane antigen and nuclear matrix protein 52 as sensitive biomarkers for detection of bladder cancer. *Int J Biol Markers*. 2015;30(4):407–13.

200. Li F, Yu Z, Chen P, et al. The increased excretion of urinary orosomucoid 1 as a useful biomarker for bladder cancer. *Am J Cancer Res.* 2016;6(2):331–40.
201. Choi S, Shin J, Lee Y, et al. Urinary APE1/Ref-1: a potential bladder cancer biomarker. *Dis Markers.* 2016;2016:1–8.
202. Srivastava A, Singh P, Singh D, Dalela D, Rath S, Bhatt M. Clinical utility of urinary soluble Fas in screening for bladder cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2016;12(2):e215–21.
203. Ebbing J, Mathia S, Seibert F, et al. Urinary calprotectin: a new diagnostic marker in urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol.* 2014;32(6):1485–92.
204. Shimada K, Fujii T, Tatsumi Y, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. Ubiquilin2 as a novel marker for detection of urothelial carcinoma cells in urine. *Diagn Cytopathol.* 2016;44(1):3–9.
205. Konety B, Nguyen T, Dhir R, et al. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein, BLCA-4. *Clin Cancer Res.* 2000;6(7):2618–25.
206. Le T, Miller R, Barder T, Babjuk M, Potter D, Getzenberg R. Highly specific urine-based marker of bladder cancer. *Urology.* 2005;66(6):1256–60.
207. Le T, Myers J, Konety B, Barder T, Getzenberg R. Functional characterization of the bladder cancer marker, BLCA-4. *Clin Cancer Res.* 2004;10(4):1384–91.
208. Konety B, Nguyen T, Brenes G, et al. Clinical usefulness of the novel marker BLCA-4 for the detection of bladder cancer. *J Urol.* 2000;164(3 Pt 1):634–9.
209. Myers-Irvin J, Landsittel D, Getzenberg R. Use of the novel marker BLCA-1 for the detection of bladder cancer. *J Urol.* 2005;174(1):64–8.
210. Santoni M, Catanzariti F, Minardi D, et al. Pathogenic and diagnostic potential of BLCA-1 and BLCA-4 nuclear proteins in urothelial cell carcinoma of human bladder. *Adv Urol.* 2012;2012:1–5.
211. Mukhtar S, Perry M. Future prospects for bladder cancer biomarkers. *BJU Int.* 2011;108(10):1541–3.
212. Stoeber K, Halsall I, Freeman A, et al. Immunoassay for urothelial cancers that detects DNA replication protein Mcm5 in urine. *Lancet.* 1999;354(9189):1524–5.
213. Dudderidge T, Nabi G, Mom J, et al. A novel non-invasive aid for bladder cancer diagnosis: A prospective, multi-centre study to evaluate the ADXBLADDER test. *Eur Urol Suppl.* 2018;17(2):e1424.
214. Oeyen E, Hoekx L, De Wachter S, Baldewijns M, Ameye F, Mertens I. Bladder cancer diagnosis and follow-up: the current status and possible role of extracellular vesicles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(4):821.
215. Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yanoshita R. Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(6):1059–62.
216. Muller L, Hong C, Stolz D, Watkins S, Whiteside T. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma. *J Immunol Methods.* 2014;411(Lm):55–65.
217. Taverna S, Giallombardo M, Gil-Bazo I, et al. Exosomes isolation and characterization in serum is feasible in non-small cell lung cancer patients: critical analysis of evidence and potential role in clinical practice. *Oncotarget.* 2016;7(19):28748–60.
218. Admyre C, Johansson S, Qazi K, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 2014;179(3):1969–78.
219. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper M. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(36):13368–73.
220. Keller S, Rupp C, Stoeck A, et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 2007;72(9):1095–102.
221. Mathivanan S, Fahner C, Reid G, Simpson R. ExoCarta 2012: Database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(D1):1241–4.
222. Nawaz M, Camussi G, Valadi H, et al. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol.* 2014;11(12):688–701.
223. Kharashvili G, Simkova D, Bouchalova K, Gachechiladze M, Narsia N, Bouchal J. The role of cancer-associated fibroblasts, solid stress and other microenvironmental factors in tumor progression and therapy resistance. *Cancer Cell Int.* 2014;14(1):1–8.

224. Akers J, Gonda D, Kim R, Carter B, Chen C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1–11.
225. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic.* 2011;12(12):1659–68.
226. Zhou H, Yuen P, Pisitkun T, et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney Int.* 2006;69(8):1471–6.
227. Sun Y, Liu J. Potential of cancer cell-derived exosomes in clinical application: a review of recent research advances. *Clin Ther.* 2014;36(6):863–72.
228. Chen C, Lin T, Tsai C, et al. Identification of potential bladder cancer markers in urine by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics. *J Proteomics.* 2013;85:28–43.
229. Welton J, Brennan P, Gurney M, et al. Proteomics analysis of vesicles isolated from plasma and urine of prostate cancer patients using a multiplex, aptamer-based protein array. *J Extracell Vesicles.* 2016;5(1).
230. Lin S, Chang C, Wu H, et al. Proteome profiling of urinary exosomes identifies alpha 1-antitrypsin and H2B1K as diagnostic and prognostic biomarkers for urothelial carcinoma. *Sci Rep.* 2016;6:34446.
231. Smalley D, Sheman N, Nelson K, Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res.* 2008;7(5):2088–96.
232. Beckham C, Olsen J, Yin P, et al. Bladder cancer exosomes contain EDIL-3/Del1 and facilitate cancer progression. *J Urol.* 2014;192(2):583–92.
233. Chen C, Lai Y, Tang P, et al. Comparative and targeted proteomic analyses of urinary microparticles from bladder cancer and hernia patients. *J Proteome Res.* 2012;11(12):5611–29.
234. Silvers C, Miyamoto H, Messing E, Netto G, Lee Y-F. Characterization of urinary extracellular vesicle proteins in muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget.* 2017;8(53):91199–208.
235. Silvers C, Liu Y-R, Wu C-H, Miyamoto H, Messing E, Lee Y-F. Identification of extracellular vesicle-borne periostin as a feature of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget.* 2016;7(17):23335–45.
236. Perez A, Loizaga A, Arceo R, et al. A pilot study on the potential of RNA-associated to urinary vesicles as a suitable non-invasive source for diagnostic purposes in bladder cancer. *Cancers (Basel).* 2014;6(1):179–92.
237. Berrondo C, Flax J, Kucherov V, et al. Expression of the long non-coding RNA HOTAIR correlates with disease progression in bladder cancer and is contained in bladder cancer patient urinary exosomes. *PLoS One.* 2016;11(1):1–21.
238. Yan T-H, Lu S-W, Huang Y-Q, et al. Upregulation of the long noncoding RNA HOTAIR predicts recurrence in stage Ta/T1 bladder cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(10):10249–57.
239. Armstrong D, Green B, Seigne J, Schned A, Marsit C. MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Mol Cancer.* 2015;14(1):1–9.
240. Andreu Z, Oshiro R, Redruello A, et al. Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression. *Eur J Pharm Sci.* 2017;98:70–9.
241. Baumgart S, Hölter S, Ohlmann C-H, et al. Exosomes of invasive urothelial carcinoma cells are characterized by a specific miRNA expression signature. *Oncotarget.* 2017;8(35):58278–91.
242. Matsuzaki K, Fujita K, Jingushi K, et al. MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(15):24668–78.

ANEXOS

Tabela I - Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o marcador BTA

Biomarcador	Avaliação	Sensibilidade (95% IC)	Nº de estudos	Especificidade (95% IC)	Nº de estudos
<i>BTA Stat</i> [®]	Geral	0.64 (0.58-0.69)	22	0.77 (0.73-0.81)	21
	Diagnóstico*	0.76 (0.67-0.83)	8	0.78 (0.66-0.87)	6
	Seguimento	0.60 (0.55-0.65)	11	0.76 (0.69-0.83)	8
<i>BTA Trak</i> [®]	Geral	0.65 (0.54-0.75)	4	0.74 (0.64-0.82)	4
	Diagnóstico*	0.76 (0.61-0.87)	1	0.53 (0.38-0.68)	1
	Seguimento	0.58 (0.46-0.69)	2	0.79 (0.72-0.85)	2

*Diagnóstico primário em doentes sintomáticos

Tabela II – Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o biomarcador NMP22

Biomarcador	Avaliação	Sensibilidade (95% IC)	Nº de estudos	Especificidade (95% IC)	Nº de estudos
<i>NMP22 BC test kit</i> [®]	Geral	0.69 (0.62-0.75)	19	0.77 (0.70-0.83)	19
	Diagnóstico*	0.67 (0.55-0.77)	9	0.84 (0.75-0.90)	7
	Seguimento	0.61(0.49-0.71)	10	0.71 (0.60-0.81)	8
<i>NMP22 BladderChek test</i> [®]	Geral	0.58 (0.39-0.75)	4	0.88 (0.78-0.94)	4
	Diagnóstico*	0.47 (0.33-0.61)	2	0.93 (0.81-0.97)	2
	Seguimento	0.70 (0.40-0.89)	2	0.83 (0.75-0.89)	2

*Diagnóstico primário em doentes sintomáticos

Tabela III - Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o marcador uCyt+™

Biomarcador	Avaliação	Sensibilidade (95% IC)	Nº de estudos	Especificidade (95% IC)	Nº de estudos
uCyt+™	Geral	0.78 (0.68-0.85)	14	0.78 (0.72-0.82)	14
	Diagnóstico*	0.85 (0.78-0.90)	6	0.83 (0.77-0.87)	7
	Seguimento	0.75 (0.64-0.83)	7	0.76 (0.70-0.81)	8

*Diagnóstico primário em doentes sintomáticos

Tabela IV - Sensibilidade e especificidade no diagnóstico e no seguimento com o marcador UroVysion™

Biomarcador	Avaliação	Sensibilidade (95% IC)	Nº de estudos	Especificidade (95% IC)	Nº de estudos
UroVysion™	Geral	0.63 (0.50-0.75)	11	0.87 (0.79-0.93)	11
	Diagnóstico*	0.73 (0.50-0.88)	2	0.95 (0.87-0.98)	1
	Seguimento	0.55 (0.36-0.72)	7	0.80 (0.66-0.89)	6

*Diagnóstico primário em doentes sintomáticos

Tabela V – Comparação da eficácia diagnóstica do NMP22 test kit® e do BTA Stat®

Biomarcador	Avaliação	Sensibilidade (95% IC)	Nº de estudos	Especificidade (95% IC)	Nº de estudos
<i>NMP22 test kit®</i>	Geral	0.69 (0.62-0.76)	7	0.73 (0.66-0.84)	7
	Estadio tumoral				
	Ta	0.54 (0.45-0.62)	5	-	-
	T1	0.81 (0.67-0.90)	5	-	-
	Grau tumoral				
	G1	0.52 (0.40-0.63)	5	-	-
	G2	0.67 (0.57-0.76)	5	-	-
<i>BTA Stat®</i>	Geral	0.66 (0.59-0.73)	7	0.76 (0.66-0.84)	7
	Estadio tumoral				
	Ta	0.53 (0.54-0.61)	5	-	-
	T1	0.77 (0.63-0.88)	5	-	-
	Grau tumoral				
	G1	0.44 (0.33-0.56)	5	-	-
	G2	0.65 (0.55-0.74)	5	-	-

Tabela VI – Comparação da eficácia diagnóstica do ImmunoCyt™ e da UroVysion™

Biomarcador	Avaliação	Sensibilidade (95% IC)	Nº de estudos	Especificidade (95% IC)	Nº de estudos
<i>ImmunoCyt™</i>	Geral	0.71 (0.54-0.84)	3	0.71 (0.62-0.79)	3
	Estadio tumoral				
	Ta	0.71 (0.46-0.87)	2	-	-
	T1	0.89 (0.66-0.97)	2	-	-
	Grau tumoral				
	G1	0.65 (0.47-0.80)	3	-	-
<i>UroVysion™</i>	Geral	0.61 (0.43-0.76)	3	0.79 (0.71-0.85)	3
	Estadio tumoral				
	Ta	0.36 (0.17-0.61)	2	-	-
	T1	0.58 (0.36-0.77)	2	-	-
	Grau tumoral				
	G1	0.42 (0.25-0.60)	3	-	-

Tabela VII - Sensibilidade e especificidade $\geq 80\%$ nos biomarcadores proteicos

(Ref.)	Biomarcador	Sensibilidade	Especificidade
(192)	Survivin	83%	81%
(193)	HtrA1	93%	96%
(194)	Survivin	85%	95%
(195)	Apo-A1	89%	85%
(196)	Hyaluronidase	88%	82%
(197)	IL-8	90%	86%
(198)	Porphyrin	100%	96%
(199)	NMP52	80%	93%
(200)	ORM1	92%	94%
(201)	APE1/Ref-1	82%	80%
(202)	sFAs	88%	89%
(203)	Calprotectin	80%	93%
(204)	Ubiquitin2	88%	99%

(HtrA1 – high temperature requirement A1; ApoA1 – Apolipoprotein A1; NMP52 –Nuclear Matrix Protein 52; ORM –Orosomuroid 1; APE1/Ref-1 – Apurinic or Apyrimidinic Endonuclease 1/ Redox Factor-1; sFAs – Soluble FAs.)