



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**ESCOLA DE FARMÁCIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**



**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**GABRIEL DA SILVA LOURENÇO**

**O MICRO-RNA COMO BIOMARCADOR NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER  
DE BEXIGA**

Ouro Preto, MG

Março de 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

GABRIEL DA SILVA LOURENÇO

O MICRO-RNA COMO BIOMARCADOR NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE  
BEXIGA

Trabalho apresentado ao curso de graduação em  
Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Farmacêutico Generalista.

Orientadora: Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva

Ouro Preto, MG

Março de 2023

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L892m Lourenço, Gabriel da Silva.

O microRNA como biomarcador no diagnóstico do câncer de bexiga.  
[manuscrito] / Gabriel da Silva Lourenço. - 2023.  
43 f.

Orientadora: Profa. Dra. Glenda Nicioli da Silva.  
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola  
de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. MicroRNAs. 2. Bexiga- Câncer. 3. Câncer - Diagnóstico. I. Silva,  
Glenda Nicioli da. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616-006.6

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza- SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
ESCOLA DE FARMÁCIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Gabriel da Silva Lourenço**

### **O Micro-RNA como biomarcador no diagnóstico do câncer de bexiga**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 31 de março de 2023

#### Membros da banca

[PhD] - Glenda Nicioli da Silva - Orientador(a) Universidade Federal de Ouro Preto  
[PhD] - Geraldo Célio Brandão - Universidade federal de Ouro Preto  
Isadora Oliveira Ansaloni Pereira - Universidade Federal de Ouro Preto

[Glenda Nicioli da Silva], orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 31/03/2023



Documento assinado eletronicamente por **Glenda Nicioli da Silva, VICE-DIRETOR(A) DA ESCOLA DE FARMÁCIA**, em 31/03/2023, às 08:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0502001** e o código CRC **5642A56B**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração aos professores que acreditaram em mim e me proveram com as ferramentas e oportunidades necessárias para concluir esta fase extremamente difícil da minha vida. Agradeço pela confiança, pela empatia, pelo respeito e pelo empenho de vocês para com a minha formação. Então, dirijo meu “muito obrigado” a Gustavo H. B. de Souza, Nancy S. Binda, Orlando D. H. dos Santos, e, em especial, à minha orientadora Glenda N. da Silva. Se enxerguei longe é porque subi muito alto, ou alguma coisa assim, não é? Aonde quer que eu chegue, serão vocês que terão permitido isso, muito obrigado.

Também agradeço com carinho a todos os meus colegas de curso e amigos que me acompanharam nessa jornada: Wilson Mendes, Ramon Magalhães e Izamara Martins. Também deixo aqui, emocionado, meu eterno abraço ao Alex Ferreira, obrigado por me ajudar a descobrir o tipo de pessoa que quero ser.

Por fim, agradeço à República Federativa do Brasil e ao Estado Democrático de Direito. Estruturas tão fragilizadas, envoltas na vertiginosa corrente corruptiva que desintegra um sistema que deveria existir para nos servir. Agradeço à democracia por permitir que nosso país volte a respirar, livre da sombra fascista que poderia estar assinando meu diploma, mas, graças a Deus, não irá. A primavera sempre chega.

*“Hoje você é quem manda  
Falou, 'tá falado  
Não tem discussão, não  
A minha gente hoje anda falando de lado  
E olhando pro chão, viu  
Você que inventou esse estado  
E inventou de inventar  
Toda a escuridão  
Você que inventou o pecado  
Esqueceu-se de inventar  
O perdão*

*Apesar de você  
Amanhã há de ser outro dia  
Eu pergunto a você onde vai se esconder  
Da enorme euforia  
Como vai proibir  
Quando o galo insistir  
Em cantar  
Água nova brotando  
E a gente se amando sem parar”*

**(Chico Buarque)**

## RESUMO

O câncer de bexiga é a nona maior causa de morte por câncer no mundo, vitimando centenas de milhares de pessoas por ano. Seu diagnóstico é difícil, pois, seu principal sinal clínico, a hematúria, é extremamente inespecífica. Ao mesmo tempo, o câncer atinge o estágio de invasão tecidual, que leva à hematúria, é um sinal de tumores de alto grau. Silencioso em seus estágios iniciais, o carcinoma de células uroteliais se torna uma doença de diagnóstico demorado e com grande chance de ocorrência de metástases e recidivas. O microRNA é um constituinte do genoma não-codificante capaz de regular a síntese proteica em nível pós-transcricional, silenciando ou induzindo a degradação de RNA mensageiros. A expressão de microRNA é basal em todos os tipos celulares, ao passo que o perfil de expressão é particular a cada um. Centenas de microRNAs diferentes já foram identificados e classificados em famílias e subfamílias, além de também poderem se encontrar unidos em *clusters*. O conjunto de microRNAs produzidos em uma célula se torna uma característica exclusiva a ela, de acordo com suas próprias funções metabólicas. Investigações dos mecanismos moleculares do câncer revelaram que o miRNA desempenha um papel importante nesta doença, estando pontualmente desregulado e tendo uma participação direta na mediação de processos de invasão tecidual e divisão celular. A presente revisão narrativa investigou os microRNAs particularmente desregulados em cânceres de bexiga a partir de trabalhos da literatura, com o intuito de formar um painel de biomarcadores para o diagnóstico mais precoce da doença. A investigação levantou dados pertinentes que corroboram para a conclusão das pesquisas que vem sendo feitas nesta área: a de que os microRNA podem ser utilizados para identificar indivíduos com câncer de indivíduos sem câncer. Além disso, há dados suficientes para que o microRNA possa estar associado, também, a gravidade tumoral, nível de invasão tecidual e diferenciação celular. Concluiu-se que, dentre todos os microRNAs analisados, os miR-125b, miR-143, miR-150, miR-503, miR-93, miR-145 e miR-200b mostraram-se com excelente potencial para diagnóstico e avaliação prognóstica do câncer de bexiga. Esses microRNA, e outros, precisam ser mais investigados para que mais dados possam ser obtidos, confirmando ou refutando o que foi descoberto até agora. Contudo, não é apenas a identificação de biomarcadores o único obstáculo para o diagnóstico precoce do câncer de bexiga. São muitos os microRNA com potencial para identificar doenças, não apenas o câncer. E, com exceção de biópsias, todas as amostras podem apresentar, também, os microRNA de outros tecidos. Por isso, é imprescindível que estes dados sejam computados em um banco de dados, e que ferramentas de informática sejam desenvolvidas para utilizá-los. Também é necessário desenvolver um método de análise molecular próprio para análise de microRNA, com uma amostra padronizada. Há muitas pesquisas engajadas na solução destes problemas, e o uso de microRNA para o diagnóstico de doenças é uma possibilidade real para o futuro.

**Palavras-chave:** microRNA, miRNA, câncer, bexiga, urotelial, diagnóstico, ncRNA.

## ABSTRACT

Bladder cancer is the ninth leading cause of cancer death in the world, killing hundreds of thousands of people every year. Its diagnosis is difficult because its main clinical sign, hematuria, is extremely nonspecific. At the same time, the cancer reaching the stage of tissue invasion, which leads to hematuria, is a strong sign of high-grade tumor. Silent in its initial stages, urothelial cell carcinoma becomes a disease with a time-consuming diagnosis and with a high chance of metastasis and recurrences. MicroRNA is a constituent of the non-coding genome, capable of regulating protein synthesis at the post-transcriptional level, silencing or inducing degradation of messenger RNA. MicroRNA expression is basal in all cell types, whereas the expression profile is particular to each one. Hundreds of different microRNAs have already been identified and classified into families and subfamilies, in addition to being found united in clusters. The set of microRNAs produced in a cell becomes an exclusive characteristic of it, according to its own metabolic functions. Investigations of the molecular mechanisms of cancer revealed that miRNA plays an important role in this disease, being specifically deregulated and having a direct participation in mediating processes of tissue invasion and cell division. A survey of studies that investigated the particularly dysregulated microRNAs in bladder cancer was carried out, with the aim of forming a panel of biomarkers for the earlier diagnosis of the disease. The investigation raised relevant data that corroborate the conclusions of other researches in this field: that microRNAs can be used to identify individuals with cancer from individuals without cancer. In addition, there are enough data to believe that microRNA can also assess tumor severity, level of tissue invasion and cell differentiation. It was concluded that, among all the analyzed microRNAs, miR-125b, miR-143, miR-150, miR-503, miR-93, miR-145 and miR-200b showed excellent potential for diagnosis and prognostic evaluation of the bladder cancer. These microRNAs, and others, need to be further investigated so that more data can be obtained, confirming or refuting what has been discovered so far. However, the identification of biomarkers is not the only obstacle to the early diagnosis of bladder cancer. There are many microRNAs with the potential to identify diseases, not just cancer. And, with the exception of biopsies, all samples may also show microRNAs from other tissues. Therefore, it is essential that these data are computed in a database, and that softwares are developed to use them. It is also necessary to develop a molecular analysis method specific for microRNA analysis, with a standardized sample. There is a lot of research engaged in solving these problems, and the use of microRNA for the diagnosis of diseases is a real possibility for the future.

**Keywords:** microRNA, miRNA, cancer, bladder, urothelial, diagnosis, diagnostic, ncRNA.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AGO - Proteínas Argonautas

BBSRC - Conselho de Pesquisa em Biociências e Biotecnologia

ceRNA - RNA Competitivo Endógeno

DS - Deep Sequencing

EDTA - Etilenodiaminotetracetato

EMT - Transição Epitélio-Mesenquimal

FSCN I - Proteína Homóloga de Fascin I

HGNMIBC – High Grade Non-Muscle Invasive Bladder Cancer

inv-UCC - Carcinoma de Células Uroteliais Invasivo

LGNMIBC – Low Grade Non-Muscle Invasive Bladder Cancer

MIBC - Muscle Invasive Bladder Cancer

miRNA - microRNA

MMP-16 - Metaloproteinase de Matriz 16

ncRNA - RNA Não Codificante (Non-Coding RNA)

NMIBC - Non-Muscle Invasive Bladder Cancer

nsRNA - RNA Nuclear Pequeno

onco-miRNA - miRNA Oncogênico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

RISC - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

RNAPol - RNA Polimerase

RNPC - Complexo Ribonucleoproteico Contendo RNA

RT-qPCR - PCR Quantitativa com Transcriptase Reversa

SBU - Sociedade Brasileira de Urologia

sncRNA - RNAs Pequenos Não-Codificantes

snoRNA - RNA Nucleolar Pequeno

SNP - Polimorfismos de Base Única

ssRNA - RNA De Fita Simples (Single Strain RNA)

TCC - Carcinoma de Células Transicionais

TS-miRNA - miRNA Supressor de Tumor

UCC - Carcinoma de Células Uroteliais

UTR - Região Não-Traduzida

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Classificação dos tumores de bexiga.....	12
Figura 2 Diagnóstico do câncer de bexiga.....	15
Figura 3 Biogênese do miRNA.. ..	16
Figura 4 Preparo e leitura de um microarray.....	18
Figura 5 Detecção fotoeletroquímica de microRNA.....	19
Figura 6 Método de molécula simples para detecção de miRNA .....	20

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Classificação dos tumores de bexiga. ....	13
Tabela 2 Identificação dos estudos incluídos na análise .....	27
Tabela 3 Expressão alterada de miRNAs de acordo com o estágio tumoral, por autor. ....	28

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
2.1. Objetivo geral .....	10
2.2. Objetivos específicos .....	10
3. MÉTODO	10
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4.1. Câncer .....	11
4.2. Câncer de Bexiga .....	11
4.3. Diagnóstico do Câncer de Bexiga .....	14
4.4. Micro-RNA .....	15
4.5. O micro-RNA como biomarcador .....	17
4.6. O micro-RNA como biomarcador no câncer .....	20
4.7. Micro-RNA como biomarcador no diagnóstico do câncer de bexiga .....	22
5. RESULTADOS	26
6. CONCLUSÕES	38
7. BIBLIOGRAFIA	39

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma denominação comum a mais de 100 doenças diferentes. O que elas possuem em comum é o crescimento celular desordenado. Elas diferem no tipo de célula que originou o câncer. Cada tipo celular possui responsividade diferente, necessidades nutricionais e suas próprias características metabólicas (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021). No caso do câncer de bexiga, sua estrutura é formada por células epiteliais apicais da luz da bexiga, e constitui a nona maior causa de câncer no mundo, vitimando 200.000 pessoas por ano (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

Uma característica que torna essa doença preocupante para os sistemas de saúde é o alto potencial para recidiva e metástase. Outro problema é o seu diagnóstico: os primeiros estágios da doença podem ser assintomáticos, de modo que o primeiro sinal clinicamente relevante, a hematúria, surge apenas em estágios avançados. Além disso, entre a detecção da hematúria e a confirmação do diagnóstico de câncer, existem etapas que retardam o diagnóstico, dando tempo para a doença progredir antes de ser detectada e tratada (DEGEORGE; HOLT; HODGES, 2017).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), quando há detecção de hematúria, deve-se realizar urinocultura e análise com fita reativa, e um novo exame de urina deve ser realizado após duas semanas. Se a hematúria persistir, são feitas análises morfológicas das hemácias, e avaliação de fatores de risco. Em caso de hemácias isomórficas e presença de fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, é feito o exame confirmatório: a cistoscopia, ou uretrocistoscopia (DA COSTA *et al.*, 2017).

Sabe-se que inúmeras alterações genéticas e epigenéticas estão envolvidas no câncer, dentre elas, a modulação dos microRNAs (miRNAs), descobertos em 1993. Constituintes do genoma não codificante, os miRNA são reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional, pois ligam-se por complementariedade de bases a moléculas de RNA mensageiro, modulando sua tradução ou induzindo sua degradação. Dessa forma, os miRNA atuam como um mecanismo de ajuste fino da síntese proteica (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014). Em geral, as moléculas de miRNA possuem aproximadamente 18 – 24 nucleotídeos, e estão diferencialmente expressos nos vários tecidos e sistemas biológicos (KAPPEL e KELLER, 2016).

A participação do miRNA nos mecanismos moleculares do câncer vem sendo elucidada. Foram identificados muitos alvos de ação de miRNAs, e entre eles estão os oncogenes e os genes supressores de tumor. Dessa forma, as mesmas mutações que interferem na expressão de proteínas do ciclo celular, podem interferir na expressão de miRNAs reguladores do ciclo celular, de modo que diferentes células tumorais possuem diferentes perfis de expressão de miRNA (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

De acordo com MANTEROLA, GURUCEAGA, *et al.*, 2014, tumores malignos expressam, em maior escala, exossomas nos fluidos corporais, que atuam como reservatórios de biomarcadores moleculares. Esses exossomas são microvesículas que despertaram interesse

experimental, por possuírem estabilidade, favorecendo o uso de amostra de sangue para diagnóstico tumoral. Assinaturas de miRNA podem ser encontradas nessas microvesículas. Esse tipo de amostra pode ser útil para o diagnóstico de outros cânceres, mas para o câncer de bexiga, a amostra ideal seria a urina que, a princípio, não apresentaria miRNA de outros tecidos que não ela mesma.

A análise do perfil de expressão de miRNA de um tecido pode permitir um diagnóstico mais precoce da doença, determinar o estágio de desenvolvimento do tumor, prever sua responsividade ao tratamento e prever sua susceptibilidade ao câncer, recidiva ou metástase. Além disso, é possível identificar assinaturas de miRNA em urina (MENGUAL, LOZANO, *et al.*, 2013), o que é menos invasivo, caro e dispendioso que a uroscopia.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

- Descrever miRNAs com potencial diagnóstico para câncer de bexiga.

### 2.2. Objetivos específicos

- Verificar os principais métodos diagnósticos para o câncer de bexiga;
- Identificar os miRNAs que são diferencialmente expressos em tecido normal e tumores de bexiga;
- Determinar os principais miRNAs que estão associados ao grau e estadiamento tumoral;
- Discutir sobre possíveis miRNAs que possam ser utilizados para diagnósticos dos tumores de bexiga.

## 3. MÉTODO

O presente trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica narrativa, cujo método baseia-se em um levantamento bibliográfico em bases de dados científicas, buscando diferentes combinações das palavras-chave: miRNA, micro-RNA, biomarcadores, detecção, bexiga e câncer, em diferentes combinações e variações.

As bases de dados que foram utilizadas são Pubmed e Google Scholar. Ao fim das pesquisas em cada base, as referências duplas foram excluídas. Muitas referências também foram obtidas nos capítulos de “Referências Bibliográficas” das bibliografias encontradas nas plataformas.

Não haverá restrição quanto ao idioma. Foram incluídos trabalhos experimentais e de revisão, sem restrição de ano. Anteriormente à análise dos dados, havia um critério de exclusão: dentre os biomarcadores cuja especificidade fora avaliada, apenas seriam incluídos os que apresentaram pelo menos 80% de especificidade. Serão utilizados todos os artigos que oferecerem informações importantes e complementares para responder ao objetivo proposto.

As fases da pesquisa foram: levantamento bibliográfico, leitura e sistematização da bibliografia de referência levantada, construção do referencial teórico, descrição e categorização dos dados e conclusão.

#### 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

##### 4.1. Câncer

Uma célula tumoral perde sua capacidade de controle do ciclo celular. Isso ocorre principalmente em decorrência do surgimento de mutações. Existem genes chamados proto-oncogenes que podem sofrer mutações e, quando isso ocorre, se tornam ativados e passam a ser chamados de oncogenes. A partir disso, a célula já não se comporta mais como deveria. Contudo, pode levar anos até que esta célula forme um tumor visível ou cause problemas perceptíveis ao paciente. O organismo dispõe, ainda, de sistemas de defesa como o sistema de reparo do DNA, que pode retardar ou impedir o desenvolvimento da doença. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021)

A evolução de um câncer, desde a célula mutada até um tumor clinicamente detectável, envolve diferentes estágios que são consequência do efeito cumulativo de vários agentes cancerígenos. O primeiro estágio é a Iniciação, que constitui a ação de um agente cancerígeno sobre o DNA, ativando proto-oncogenes. Em seguida, está o estágio da promoção, onde a célula ativada entra em contato continuado com um agente oncopromotor. Nesta etapa, a célula irá lenta e gradualmente se tornar maligna, ou seja, sua divisão celular começa a sair do controle. Por último, em decorrência do contato com oncoaceleradores, o tumor alcança o estágio de progressão, onde a multiplicação celular está irreversivelmente descontrolada. Nesta etapa, passam a ser observáveis os primeiros sinais clínicos. O tabaco é um agente carcinógeno completo, pois possui componentes que atuam nos três estágios da carcinogênese. (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021)

##### 4.2. Câncer de Bexiga

No Brasil, foram registrados 10.640 novos casos de câncer de bexiga em 2020, o que representa 1,6% do total de casos de câncer (KORKES; MALUF, 2021). No mundo, a cada ano, são registrados (aproximadamente) 500.000 novos casos e 200.000 mortes, e em 2020, existiam 1,6 milhões de pessoas vivendo com a doença (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

O câncer de bexiga é um subtipo (e representa 95% dos casos) de câncer urotelial. Outros tipos de câncer urotelial são neoplasias no trato urinário superior (bacinete e ureteres), uretra proximal e adenocarcinomas. O sinal clínico mais comum entre cânceres de bexiga é a hematúria. Apesar disso, apenas 16,5% dos pacientes que apresentam hematúria estão com câncer de bexiga, sendo este um sinal clínico altamente inespecífico (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

Dentre os fatores de risco melhor estabelecidos, estão: gênero, o risco de desenvolver câncer de bexiga ao longo da vida é de 0,27% em mulheres e 1,1% em homens (LENIS, LEC e CHAMIE, 2020); tabagismo, FREEDMAN, SILVERMAN, *et al.* conduziram, em 2011 um

estudo de coorte que acompanhou cerca de 460.000 pessoas durante 11 anos (1995 – 2006) e constatou que a probabilidade de desenvolvimento do câncer de bexiga era 3 vezes maior em ex-fumantes do que em pessoas que nunca fumaram, e 4,5 vezes maior entre fumantes e “nunca-fumantes”; idade, o diagnóstico ocorre entre 70 e 84 anos, em média; toxicologia ocupacional, através da exposição crônica a compostos derivados do benzeno e aminas aromáticas (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

Em termos fisiopatológicos, o câncer de bexiga se inicia no urotélio, a camada apical de tecido epitelial, na luz do trato urinário. A partir do urotélio, a neoplasia pode migrar para a membrana basal e para as camadas de tecidos subjacentes, que são duas camadas de tecido muscular, um tecido adiposo e outro epitélio, todos altamente vascularizados. Essa invasão tecidual favorece a presença de células metastáticas na corrente sanguínea (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

O tumor pode se apresentar em diferentes níveis de invasão tecidual. Como se vê na **figura 1** (SANLI, DOBRUCH, *et al.*, 2017), a cada camada de tecido invadida, o tumor alcança um novo estágio. Cada estágio tumoral representa um fenótipo (**tabela 1**), causado por mutações em diferentes genes e, conseqüentemente, com expressão diferencial de RNAs e proteínas. Ou seja, os estágios (ou fenótipos) tumorais são caracterizados pelo grau de invasão tecidual; existem sete estágios que o câncer de bexiga pode alcançar: Cis (ou Tis), Ta, T1, T2, T3 e T4.

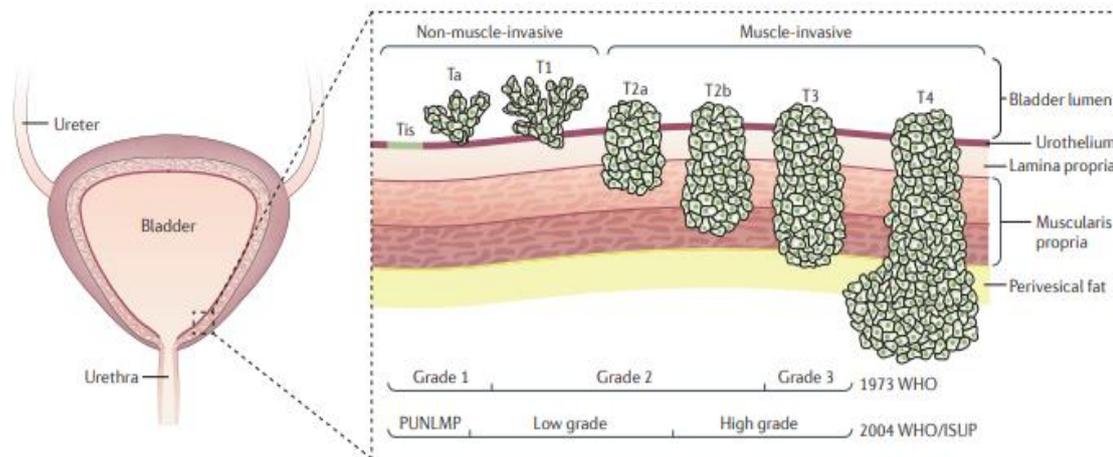


Figura 1 **Classificação dos tumores de bexiga.** Representação esquemática de diferentes tumores de bexiga em variados graus de invasão tecidual, identificados de acordo com a classificação indicada na tabela 1. Retirado de SANLI, DOBRUCH, *et al.*, 2017.

A invasão muscular é um marco importante na progressão da doença, de modo que os cânceres de bexiga também podem ser classificados em dois grupos: aqueles que não envolvem invasão muscular (CIS, Ta e T1) e aqueles que envolvem (T2, T3 e T4). O primeiro grupo é chamado de NMIBC (do inglês, *non-muscle-invasive bladder cancer*) e o segundo, de MIBC (do inglês, *muscle-invasive bladder cancer*) (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020).

**Tabela 1** Classificação dos tumores de bexiga. Classificação de tumores de bexiga de acordo com a profundidade da invasão tecidual, adaptada. CIS\*: Fenótipo especial com lesão extensa e plana e de alta recorrência.

<b>Estágio Tumoral</b>	<b>Profundidade da Invasão</b>
Ta	Carcinoma Papilar Não-Invasivo
CIS (carcinoma <i>in situ</i> )	Carcinoma Papilar Não-Invasivo
T1	Invasão da Lâmina Própria
T2a	Invasão Muscular
T2b	Invasão Muscular
T3	Invasão Perivesical
T4	Extensão Extravesical

Fonte: Autoria Própria.

Todos os tumores, de modo geral, podem ser divididos em graus de agressividade, de acordo com o grau de diferenciação apresentado pelas células cancerosas. A diferenciação é avaliada por características morfológicas, que são particulares a cada tipo de tecido (MATULAY; KAMAT, 2018). A maioria das neoplasias são classificadas em três graus (1 – 3), tumores cerebrais possuem quatro (1 – 4) e cânceres de próstata seguem a escala Gleason (6 – 10). O sistema de classificação da agressividade do câncer de bexiga, preconizado pela Organização Mundial da Saúde, é dividido de forma binária em alto e baixo graus (HUMPHREY *et al.*, 2016).

Como o grau de agressividade do tumor reflete sua capacidade de invasão tecidual, tem-se que a maioria dos tumores de baixo grau encontram-se nos estágios Ta – T2a. Seguindo a mesma lógica, a maioria dos tumores  $\geq$ T2b serão de alto grau, mas existem exceções. Uma delas é o CIS que, apesar de não apresentar invasão tecidual, apresenta níveis de diferenciação celular, agressividade e recidiva condizentes com tumores de alto grau (MATULAY, 2018).

Com isso, torna-se possível classificar o tumor de acordo com o grau de invasão tecidual, separando-o nos sete estágios citados acima, ou de acordo com o grau de diferenciação das células neoplásicas com relação à célula que as originou, separando os tumores em graus (alto e baixo).

Estudos independentes identificaram mutações em comum entre vários pacientes com NMIBC (genes FGFR3, PIK3CA, STAG2, RTK/RAS/RAF) e com MIBC (genes ERBB2, p53, RB1, MDM2, CDKN2A, KDM6A, ARID1A) (LENIS; LEC; CHAMIE, 2020). Isso mostra como um mesmo câncer (nesse caso, o de bexiga) pode apresentar diferentes fenótipos, e essas diferenças são discerníveis em nível molecular. Essas mutações influenciam diretamente a prospecção do quadro clínico, a resposta ao tratamento, a susceptibilidade ao desenvolvimento ou agravamento da doença e abrem portas para uma eficiente ferramenta prognóstica.

#### 4.3. Diagnóstico do Câncer de Bexiga

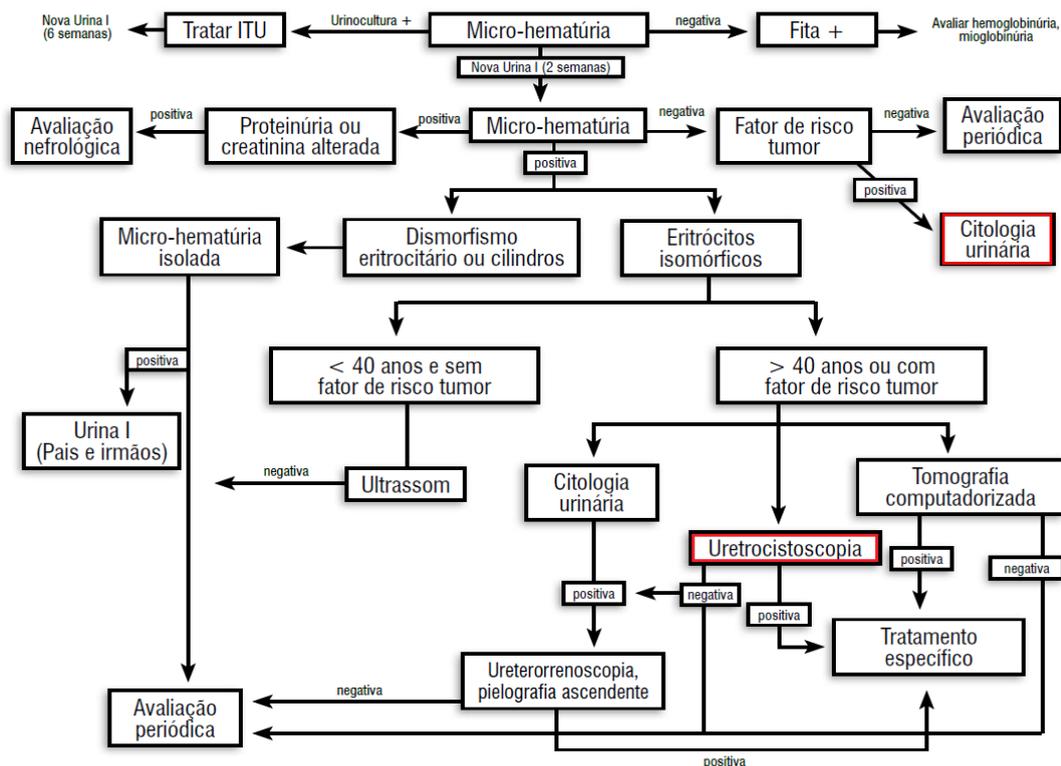
O principal achado clínico do câncer de bexiga, a hematúria, não é um bom biomarcador para detecção da doença, devido a sua falta de especificidade. Em outras palavras, não é possível associar a hematúria ao câncer de maneira conclusiva para fins de diagnóstico. Além da hematúria, outros sintomas e sinais são a irritação ou desconforto na micção e sintomas obstrutivos do trato urinário, como a oligúria.

Quando, em um exame de rotina, é detectada hematúria, a Sociedade Brasileira de Urologia orienta que seja seguido o algoritmo ilustrado na **figura 2**. Os exames confirmatórios de um paciente sob suspeita de câncer de bexiga são a cistoscopia e a citologia. O primeiro é um exame invasivo de alta sensibilidade, exceto em casos de carcinoma *in situ*, o segundo possui alta especificidade, mas baixa sensibilidade (MENGUAL, LOZANO, *et al.*, 2013).

Em caso de suspeita de neoplasia metastática, deve ser pedido um hemograma completo e determinação de perfil metabólico, incluindo fosfatase alcalina e avaliação de função renal, e um exame de cistoscopia urinária (DEGEORGE; HOLT; HODGES, 2017). A cistoscopia consiste na inserção de uma câmera de 5mm de diâmetro na uretra, e ainda é essencial para o diagnóstico definitivo.

O acompanhamento da evolução de um paciente é menos problemático que o diagnóstico. Quando o câncer de bexiga é confirmado, a hematúria passa a servir como parâmetro válido para acompanhamento da eficácia do tratamento (DEGEORGE; HOLT; HODGES, 2017). Além disso, é feita a dosagem de biomarcadores de urina, como a proteína NMP22, um biomarcador tumoral (USUBA *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, o exame de cistoscopia é recomendado a todos os pacientes que apresentam hematúria visível a olho nu, e a todos os pacientes acima de 35 anos que apresentam microhematúria. Pacientes que apresentam microhematúria associada a fatores de risco (tabagismo, exposição a carcinógeno) ou a sintomas sugestivos (oligúria, desconforto na micção) são submetidos a cistoscopia, independentemente de sua idade (DEGEORGE; HOLT; HODGES, 2017).



**Figura 2** Diagnóstico do câncer de bexiga. Fluxograma que instrui ao clínico como proceder em caso de microhematúria. Adaptado de JÚNIOR, DOS REIS e CAMPOS, 2010.

É possível perceber que o diagnóstico, além de invasivo, tende a ocorrer em estágios mais avançados da doença: o exame conclusivo, a cistoscopia, só é feito quando há achados clínicos consideráveis, como a hematúria. A presença de hemácias na urina já é um indicador de agravamento da doença. Considerando a alta taxa de recorrência do câncer de bexiga, é necessário o desenvolvimento de uma metodologia capaz de detectar a doença ainda em estágios iniciais. Entretanto, nesses estágios o paciente quase sempre se encontra assintomático, então esse novo método teria um caráter mais profilático que investigativo.

#### 4.4. Micro-RNA

Os miRNAs são RNA não-codificantes (ncRNA, do inglês *non-coding RNA*) de fita simples (ssRNA, do inglês *single strain*) de 19 a 25 nucleotídeos de extensão (KIM, 2005). Durante alguns anos após sua descoberta em 1993, acreditava-se que estas biomoléculas não possuíam função. Após quase três décadas de investigação, hoje é possível afirmar seguramente que o miRNA exerce um importante papel regulatório sobre a expressão gênica, sendo mais um constituinte do genoma não-codificante (IORIO; CROCE, 2012).

Em humanos, sua síntese se dá via RNA polimerase II (RNAPol II) (RANI e VISHNOI, 2017). Alguns genes que codificam para miRNA localizam-se em íntrons, enquanto outros se localizam em regiões intergênicas e possuem seus próprios promotores (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). A RNAPol II gera um transcrito primário dupla-fita de cadeia longa, em

formato de grampo, chamado miRNA primário (ou pri-miRNA). Este produto é processado ainda no núcleo pela enzima Drosha (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). A Drosha possui duas subunidades RNase III e um domínio de ligação a RNA dupla-fita (IORIO; CROCE, 2012). Após este processamento baseado em clivagem, obtém-se o pré-miRNA. Em seguida, por meio do transportador exportina-5, o pré-miRNA deixa o núcleo e avança para o citoplasma onde sofre uma segunda clivagem, mediada pela Dicer, outra RNase III. Essa segunda clivagem extrai o loop terminal, findando o formato de grampo e gerando um duplex de RNA que, por sua vez, é processado pela família de proteínas argonautas (AGO). A AGO seleciona qual das fitas do duplex será mantida, formando, assim, o miRNA maduro, de fita simples (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). Ao passo que uma das fitas é selecionada para ser o miRNA maduro, a outra fita normalmente é degradada, mas pode desempenhar funções biológicas em alguns casos. Por último, a molécula de miRNA é acoplada ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC – *RNA-induced silencing complex*), formando o Complexo Ribonucleoproteico contendo RNA (RNPC – *RNA-containing ribonucleoprotein complex*), que agora está pronto para exercer sua função regulatória na região 3' não-traduzida (UTR, do inglês *untranslated region*) do RNA mensageiro (mRNA) (Figura 3) (KIM, 2005).

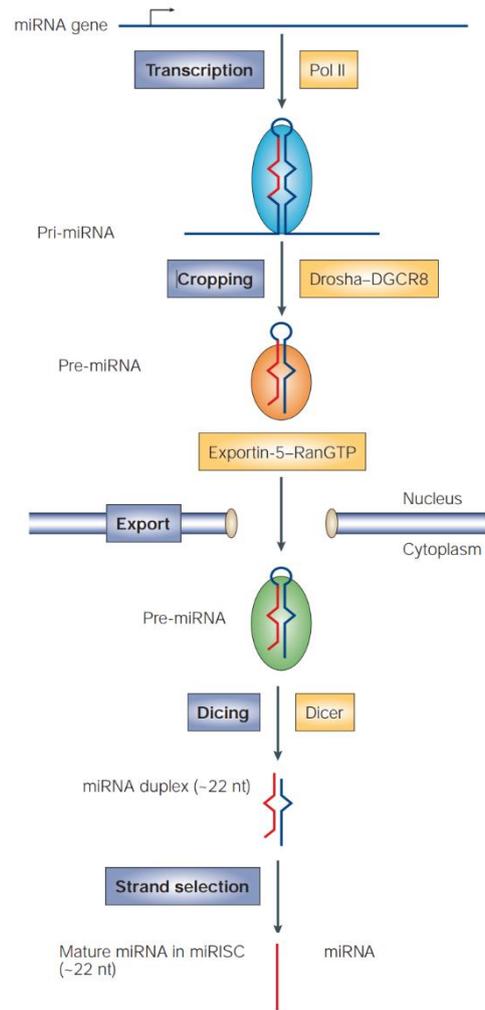


Figura 3 Biogênese do miRNA. Retirado de KIM, 2005.

Essa função se baseia na complementariedade entre o miRNA e moléculas de mRNA. Quando há tal complementariedade, mesmo que parcial, os dois ácidos nucleicos ligam-se um ao outro. Essa ligação pode inibir a tradução do mRNA ou ordenar sua degradação (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017). O que determina o efeito do miRNA é a extensão da complementariedade entre o miRNA e o mRNA alvo. O miRNA irá induzir a degradação do mRNA quando ambos tiverem complementariedade suficiente para isso, e inibirá sua tradução quando a complementariedade não for suficiente para induzir a degradação. Com isso, o miRNA exerce a função de ajuste fino da expressão gênica (BARTEL, 2004).

A molécula de miRNA, dessa forma, é um oligômero de bases ribonucleicas. Sua variabilidade estrutural o levou a ser classificado em famílias e subfamílias. Hoje em dia, já é comprovado que as várias famílias de miRNA são diferencialmente expressas pelas células e sistemas biológicos, e ainda que tecidos saudáveis possuem um perfil de expressão diferente dos doentes (NEELY *et al.*, 2006).

#### 4.5. O micro-RNA como biomarcador

Como um biomarcador, o miRNA pode ser detectado em fluidos biológicos, como sangue, saliva, muco oronasal e urina. Isso permite um acompanhamento menos invasivo que biópsias e exames de imagem como a endoscopia (MENGUAL, LOZANO, *et al.*, 2013).

Além disso, ao se considerar o uso do sangue como amostra para análise de miRNA, deve-se levar em consideração que o sangue carrega não somente miRNA que são secretados por outros tecidos, como também miRNAs secretados por todos os tipos celulares presentes no próprio sangue. Por isso, o sangue não ofereceria um perfil de expressão de miRNA que fosse “tecido específico”. Ademais, variações a nível tecidual da expressão de um miRNA podem levar apenas a pequenas variações nos níveis sanguíneos deste mesmo miRNA. Por fim, o tipo de anticoagulante usado para tubo de coleta de amostra de sangue costuma ser etilenodiaminotetracetato (EDTA), heparina ou citrato. Heparina e citrato podem interferir na reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo preferível o uso do EDTA. Contudo, mesmo em presença de EDTA, a expressão e degradação de ácidos nucleicos nas células sanguíneas não é interrompida, comprometendo a fidelidade da amostra ao quadro metabólico do paciente. Para uso do sangue como amostra, deve ser utilizado um agente estabilizador capaz de romper as membranas e inibir RNases sem degradar o miRNA. Tubos para obtenção de sangue para análise de RNA que atuam por este princípio existem sob os nomes de PAXgene™ (da marca PreanalytiX, Hombrechtikon, Suíça) e Tempus (da marca ThermoFisher, Waltham, MA, EUA). Para o uso de soro, o EDTA é o anticoagulante de primeira escolha (KAPPEL e KELLER, 2016).

Um estudo de 2014 avaliou a qualidade de amostras de soro de pacientes para detecção de miRNAs presentes nas supracitadas microvesículas, doravante chamados de RNA intravesiculares. Visando investigar apenas os RNA pequenos não-codificantes (sncRNA) intravesiculares, a amostra de soro foi submetida a uma sequência de tratamentos para a devida extração e purificação do RNA intravesicular. O estudo detectou uma associação característica entre expressão de miRNA e o glioblastoma multiforme, validando o uso de amostra de soro para obtenção de um perfil de expressão de miRNA (MANTEROLA *et al.*, 2014).

Mas, quando se trata de câncer de bexiga, a amostra preferencial é a urina, que entra em contato direto com o tecido doente e não carrega consigo miRNAs expressos em outros tecidos do corpo. MENGUAL, LOZANO, *et al.*, 2013, buscaram padronizar o uso de urina para diagnóstico do câncer de bexiga através do perfilamento de expressão de miRNA em pacientes e grupos controle. Os pesquisadores encontraram perfis de expressão de miRNA diferentes entre os três grupos estudados (LGNMIBC, HGNMIBC e MIBC), comprovando a qualidade desta amostra para o diagnóstico e acompanhamento de UCC.

Entretanto, ainda existem necessidades para avanços, tais como o desenvolvimento de uma metodologia rápida e barata e de um banco de dados rico com diferentes perfis de expressão de miRNA e suas respectivas implicações, e uma ferramenta para análise rápida e eficaz desses dados. Atualmente, existe um banco de dados chamado miRBase, um site de

domínio público. Este site é administrado pelo laboratório Griffiths-Jones, da faculdade de Biologia, Medicina e Saúde da Universidade de Manchester e é fomentado pelo Conselho de Pesquisa em Biociências e Biotecnologia (BBSRC) (KAPPEL; KELLER, 2016). É importante lembrar que, para a inserção de dados nestes bancos de dados, também é necessário conhecer as sequências exatas de nucleotídeos que compõem cada miRNA. Para isso, existem técnicas de sequenciamento que permitem obter estas informações.

KAPPEL; KELLER, (2016) concluiu que, apesar do diagnóstico molecular por miRNA ainda não ter se tornado um exame de rotina, já existem protótipos de ensaios promissores. A pesquisa determinou, ainda, que um futuro método de análise clínica baseado em detecção de miRNA deveria necessariamente ser constituído de cinco elementos: um tipo de amostra definido, um método de preparação de amostra definido, uma tecnologia de detecção padronizada, um banco de dados de miRNA e uma ferramenta de análise de dados (*software*). A padronização do método só se dá quando cada um desses fatores for individualmente padronizado sob o escopo do método escolhido.

Os métodos mais estabelecidos para identificação e quantificação de miRNA são adaptações de técnicas originalmente desenvolvidas para análise de DNA, como o PCR e *microarrays* (DEGLIANGELI, POMPA e FIAMMENGO, 2014).

A variação da PCR usada para identificação e dosagem de miRNA é a PCR quantitativa com transcriptase reversa (RT-qPCR). Ela consiste em uma variação da PCR original, utilizando transcriptase reversa para se obter fitas de DNA complementar a partir de fitas de RNA. Além disso, ela é quantitativa e utiliza sondas de DNA conjugados a marcadores fluorocromáticos que permitem quantificar a taxa de pareamento de fitas duplas de DNA.

*Microarrays* (**figura 4**) são um ensaio quantitativo baseado, assim como a RT-qPCR, em detecção de marcadores fluorocromáticos, cuja emissão de luz será proporcional à taxa de formação de fitas duplas (que, por sua vez, é proporcional à taxa de complementariedade entre o analito e as sondas) (COLOMBO e RAHAL, 2010). Esta técnica difere da anterior por ser realizada em uma lâmina, em cuja superfície estão aderidas sondas de DNA, distribuídos ordenadamente de modo a não se sobreponem. Isso permite o uso de várias sondas diferentes, consequentemente, permite analisar um perfil de expressão gênica, ao invés de um único gene. (HUNG e WENG, 2016).

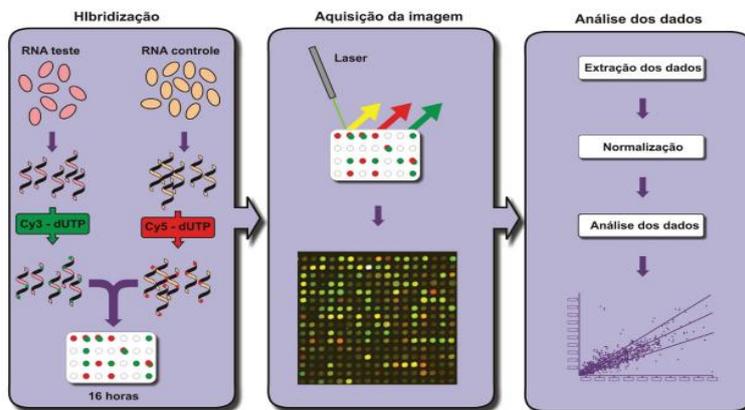


Figura 4 Preparo e leitura de um microarray. Retirado de COLOMBO e RAHAL, 2010.

Pensando nisso, novas pesquisas têm surgido visando desenvolver métodos com maior especificidade, comodidade, rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo. Entre as mais promissoras estão os protótipos de técnicas a base de nanobiotecnologia. Contudo, ainda não parece ter sido possível desenvolver um método que abranja todas as características citadas (DEGLIANGELI; POMPA; FIAMMENGO, 2014) (FIAMMENGO, 2016).

Dois estudos diferentes revisaram técnicas baseadas em nanotecnologia para detecção e/ou quantificação de miRNA (DEGLIANGELI; POMPA; FIAMMENGO, 2014) (FIAMMENGO, 2016). Considerando-se todas as técnicas analisadas em ambos os casos, a faixa de sensibilidade geral variou de 0.01 zmol ( $0,01 \times 10^{-21}$  mol) a 350 fmol ( $350 \times 10^{-15}$  mol).

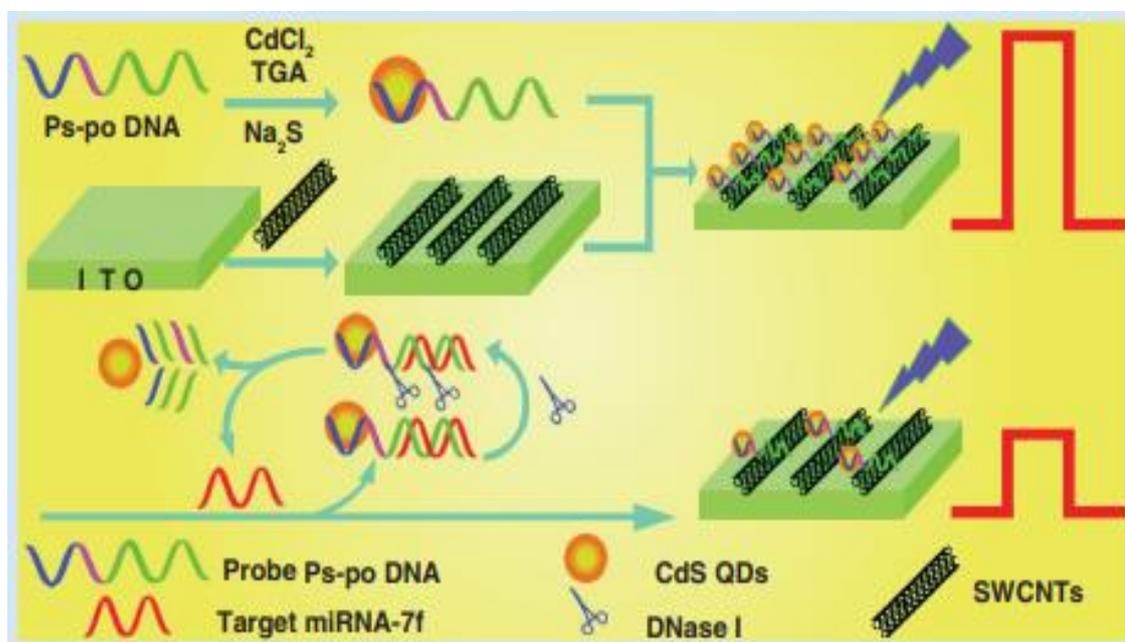


Figura 5 Detecção fotoeletroquímica de microRNA. A irradiação a 405 nm produz uma fotocorrente forte. Na presença do miRNA alvo, a hibridização desencadeia a liberação de DNA em solução e uma consequente redução na fotocorrente observada na irradiação. Retirado de FIAMMENGO, 2016.

Uma das poucas técnicas que apresenta baixo custo, e até portabilidade, é a estratégia baseada em superfície com leitura eletroquímica (**figura 5**). A limitação dessa técnica é a necessidade de muitas etapas para preparação da superfície reagente, tornando o processo dispendioso, o que é desfavorável para análise de rotina. Esse defeito pode ser contornado utilizando-se uma suspensão, ao invés de uma superfície, e leitura óptica, ao invés de eletroquímica. Nesse outro escopo, a técnica passa a ter apenas uma etapa, mas a sensibilidade diminui. (FIAMMENGO, 2016).

NEELY, (2006) analisou uma metodologia chamada Método de Molécula Simples, para quantificação de miRNA (**figura 6**). O método baseia-se no uso de sondas de DNA hibridizadas a marcadores fluorescentes. A técnica se mostrou fácil e rápida, e identificou corretamente as

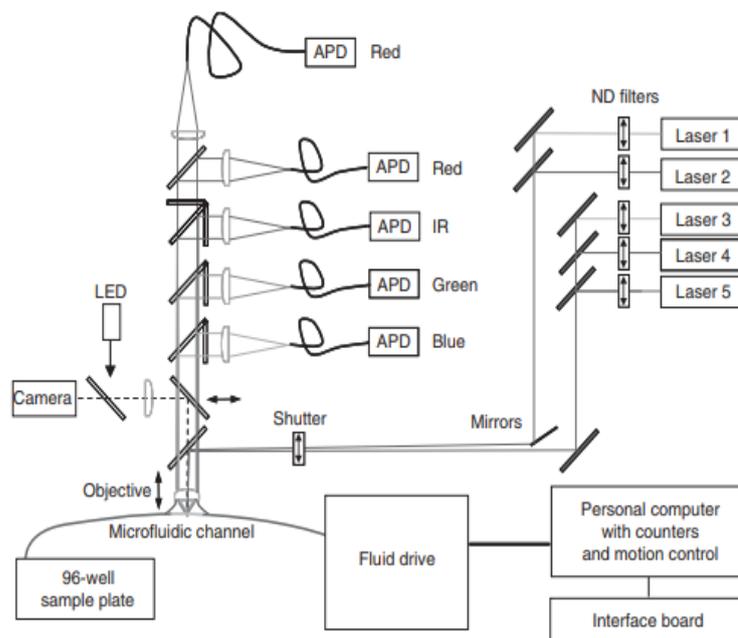


Figura 6 Método de molécula simples para detecção de miRNA. Retirado de NEELY, 2006.

diferenças de perfil de expressão de miRNA em diferentes tecidos saudáveis de um mesmo organismo. As limitações da técnica são o custo e a necessidade de elaboração de uma curva de calibração.

#### 4.6. O micro-RNA como biomarcador no câncer

Em virtude de sua participação direta na síntese proteica, os miRNA despertaram muito interesse na comunidade científica, principalmente no que concerne à sua participação nos mecanismos moleculares do câncer. Muitos estudos já comprovaram a influência da regulação pós-transcricional baseada em miRNA sobre processos de crescimento tumoral, invasão tecidual, metástase, angiogênese e evasão do sistema imune (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014). Inclusive, foi identificado que o miRNA-155 possui um papel dual na oncogênese, atuando tanto na promoção da metástase quanto da angiogênese (KONG, HE, *et al.*, 2013).

O câncer é um processo complexo, que envolve diferentes perfis de expressão de miRNA (STAHLHUT; SLACK, 2013). A expressão diferencial do miRNA em diferentes neoplasias se dá por diferentes motivos, entre eles: a amplificação ou deleção cromossômica, metilação do promotor, aumento no fator de transcrição ou mutações no grupo de enzimas que participam do processamento do miRNA (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

A análise prognóstica não precisa se basear apenas na análise quantitativa do miRNA. Já foram identificados SNPs (polimorfismos de base única) presentes nas regiões que codificam o miRNA, em regiões promotoras e em sítios de ligação do miRNA. A identificação desses polimorfismos permite prever a responsividade ao tratamento ou até a susceptibilidade genética para o desenvolvimento de câncer (DING *et al.*, 2018) (WU *et al.*, 2011) (CHIN *et al.*, 2008). Por exemplo, WU, 2011, identificou um polimorfismo no gene que codifica o mRNA que é alvo dos miR-200b/200c/429. O mesmo estudo associou a presença desse polimorfismo à resistência ao tratamento com cisplatina, um agente antineoplásico. É interessante considerar os SNPs como biomarcadores prognósticos pois podem ser identificados qualitativamente via PCR.

Além disso, um mesmo tipo de câncer também apresentará diferentes perfis de expressão de miRNA em diferentes estágios de desenvolvimento e respostas ao tratamento. Isso permite subclassificar neoplasias em grupos prognósticos, com base nesse perfil de expressão de miRNA (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

A desregulação na expressão de um miRNA pode ser tanto consequência quanto causa da neoplasia. Algumas famílias de miRNA, como miR-17~92, miR-221/222 e miR-15/16, já foram consistentemente caracterizadas como moduladoras da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

Em contrapartida, a divisão celular é mediada por uma série de mecanismos, envolvendo várias proteínas, que podem ser igualmente interrompidos pela interferência de um microRNA. A desregulação da síntese de um microRNA, seja por motivo genético, epigenético, toxicológico ou nutricional, pode levar à interferência dos mecanismos de controle do ciclo celular (MANTEROLA, GURUCEAGA, *et al.*, 2014).

Dessa forma, um exame inicial, que não apresenta desregulação em uma dessas famílias, e um exame futuro, que o apresenta, podem indicar um agravamento, progressão ou até o surgimento da neoplasia. Em contrapartida, em um paciente com sintomatologia e achados clínicos ainda inconclusivos, uma detecção alterada desses miRNA poderia acelerar significativamente o diagnóstico de um câncer (MANTEROLA, GURUCEAGA, *et al.*, 2014).

O genoma humano também possui os ceRNA (RNA competitivo endógeno): moléculas que possuem sítios de ligação com miRNAs e competem com seu mRNA alvo pelo sítio de ligação ao RISC. Os ceRNA podem ser tanto do genoma não-codificante quanto moléculas de mRNA. De modo geral, sua função é modular a atividade do miRNA, atuando como um ajuste fino do ajuste fino da expressão gênica. Foi identificado um RNA circular que possui mais de 60 sítios de ligação a miRNAs da família miR-7, ligada à supressão tumoral. O HMGA2 atua como ceRNA da família let-7, o que foi associado à progressão do câncer de pulmão (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

Diferentes famílias podem passar a ser expressas de forma associada, chamadas de *clusters*, como a família miR-17~92. Esse *cluster* é considerado oncogênico e induziu especificamente um linfoma de células B em modelos murinos (SANDHU *et al.*, 2013).

A caracterização dos perfis de expressão de miRNA em diferentes condições permitiria criar um banco de dados e, eventualmente, auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da progressão, ou regressão, da doença. Em 2014, um estudo citou vinte testes clínicos que estavam sendo feitos para identificar padrões de expressão de miRNA em diversas situações, como resposta ao tratamento e biomarcador prognóstico (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014).

Em 2014, MANTEROLA acompanhou 75 pacientes com glioblastoma multiforme e 55 voluntários saudáveis como grupo controle por 3 anos (2009 a 2012). A equipe coletou amostras de soro, tratou com RNase e DNase, para digestão de ácidos nucleicos extravesiculares, extraiu e purificou o RNA das microvesículas e perfilou 381 miRNAs na amostra de RNA purificada. O experimento identificou uma assinatura de expressão de RNAs pequenos não-codificantes (sncRNA), que envolvia 3 famílias: 2 miRNAs (miR-320 e miR-574-3p) e 1 RNA nuclear pequeno (snRNA) (RNU6-1). Essa assinatura distinguiu as células neoplásicas das saudáveis, mas essas famílias de miRNA costumam ser encontradas em outros tipos de câncer, o que compromete o diagnóstico diferencial. Por outro lado, a família RNU6-1 aparenta ser um indicador específico de glioblastoma multiforme.

Como já foi dito, seja qual for a técnica que se estabelecerá para uso em rotina, será necessário o uso de um banco de dados e uma ferramenta de análise de dados, na forma de um *software*, de modo a tornar o perfilamento rápido e eficiente.

#### 4.7. Micro-RNA como biomarcador no diagnóstico do câncer de bexiga

Uma série de trabalhos voltados para identificação de famílias de miRNA cujas expressões estivessem alteradas no câncer de bexiga foram conduzidos nos últimos anos. Muitos outros cientistas investigaram os pormenores da participação dos miRNA no processo de oncogênese do câncer de bexiga. A seguir, apresento, resumidamente, as metodologias empregadas e resultados obtidos por estes trabalhos.

CATTO, MIAH, *et al.*, 2009, analisaram amostras de células de 72 indivíduos diferentes. Foram utilizadas células uroteliais cancerosas e células normais de indivíduos com carcinoma de células uroteliais (UCC, do inglês *urothelial cell carcinoma*) e, também, células normais de indivíduos saudáveis (chamados de Grupo Controle). Além disso, eles investigaram a participação dos miRNAs 99a e 100. Comparando-se células normais de indivíduos com UCC e as células do grupo controle, foram identificados trinta e seis miRNAs desregulados, dos quais, todos estavam sendo hiperexpresso. Também foi notado que miRNAs desregulados estavam organizados em diferentes *clusters*, e a desregulação que afeta um *cluster*, o afeta como um todo, desregulando todos os miRNA nele presentes. Ao incluir as amostras de tecido urotelial maligno, encontraram doze miRNAs que eram expressos apenas no tecido doente, dos quais, cinco a sete podiam identificar o câncer urotelial com uma sensibilidade de 90% a 100%,

e uma especificidade de 80% a 100%. Dezesseis miRNAs estavam diferencialmente expressos, tanto no urotélio doente, quanto nas células normais de indivíduos com UCC. Destes, treze estavam hiperexpresso, e sete estavam muito desregulados já nas células normais, indicando um papel importante destes mecanismos nos estágios iniciais da doença, e um potencial para diagnóstico prematuro.

Ao se analisar os perfis de expressão gênica relativas à divisão fenotípica, NMI de alto e baixo grau, e UCC invasivo (inv-UCC), CATTO, MIAH, *et al.*, 2009, descobriram que havia uma grande diferença entre estes grupos. Tumores NMI de baixo grau apresentavam vinte e cinco miRNAs desregulados, dos quais dezoito estavam sendo hipoexpressos; NMI de alto grau possuíam trinta miRNAs desregulados, dos quais vinte e oito estavam sendo hiperexpressos, e os inv-UCC possuíam vinte miRNAs hiperexpressos, de um total de vinte. Também haviam quatro miRNAs que estavam igualmente desregulados em todos os fenótipos. Os autores concluíram que a expressão alterada de miRNA ocorre comumente em UCC, de maneira fenótipo-específica. Por isso, estas biomoléculas possuem um grande potencial para desempenharem a função de biomarcador. O trabalho agrega evidências de que elas permitem diagnosticar a doença, além de avaliar o estágio, grau de invasão e agressividade do tumor.

DYRSKJØT, OSTENFELD, *et al.*, 2009, também conduziram análises comparativas de perfil de expressão de miRNA entre células uroteliais malignas e outros tipos celulares. O estudo utilizou culturas de células que foram submetidas a análises de viabilidade, *microarrays* e RT-qPCR para obtenção dos resultados. Em seguida, foram feitas caracterizações para elucidar as participações do miR-129 e do miR-21 no progresso da doença. Foram utilizados três grupos de células: o primeiro foram cinco linhagens comerciais de células uroteliais cancerosas; o segundo foram linhagens comerciais de células epiteliais da bexiga imortalizadas; e o terceiro foram células obtidas por biópsia de pacientes com UCC (a coleta de alguns destes pacientes foi repetida ao longo do ano, permitindo identificar tumores que mudaram de fenótipo durante este tempo). Foram analisados duzentos e noventa miRNA, ao todo. Novamente, o fenótipo do tumor foi levado em consideração ao se analisar o perfil de expressão gênica. Isso permitiu identificar trinta miRNAs que estavam diferencialmente expressos entre os dois grupos (NMI e MI). Ademais, os perfis de expressão de miRNA dos tumores em progressão eram parecidos com os dos tumores invasivos, mostrando sinais precoces de potencial invasivo.

Análises estatísticas mostraram boas combinações de miRNAs para serem investigados quando se trata de análises prognósticas: miR-133b + miR518c\* e miR133b + miR-129, sendo a hiperexpressão do miR-129 um forte indicador de potencial de invasão tecidual, pois, estava significativamente hiperexpresso em tumores MI, NMI em progresso e tumores com CIS. Além disso, o miR-21 se mostrou um marcador diagnóstico viável para o câncer de bexiga, mas falta analisar seu perfil de expressão em outros cânceres, para avaliar sua especificidade. miR-143 e miR-145 eram os mais hipoexpressos dentre os miRNAs analisados, o que, segundo o autor, já foi identificado em outros tipos de câncer.

Comparando tumores invasivos e não-invasivos, foi encontrado que miR-141 e miR200c estavam consideravelmente hipoexpressos. Outros estudos apontam que estes miRNAs estão hipoexpressos em células que passaram pela transição epitélio-mesenquimal

(EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*). Em tumores com CIS ou invasão tecidual, também foi encontrada uma hipoexpressão do miR-320a. Exclusivo aos tumores com CIS adjacente, há o miR-498, cuja expressão está significativamente alterada (o artigo não explicita a natureza da alteração). Tumores que apresentaram posterior progresso em termos de invasão tecidual possuíam, em comum, uma hipoexpressão do miR-29. O autor concluiu que existem potenciais biomarcadores para o câncer de bexiga entre os miRNA, e que seus achados poderiam contribuir para a classificação diagnóstica e prognóstica da doença.

ENOKIDA, YOSHINO, *et al.*, 2016, conduziram uma revisão bibliográfica, levantando o que se sabia até então acerca do papel do miRNA no câncer de bexiga (sendo exatamente este o nome do trabalho). Entre os artigos revisados estavam trabalhos dos próprios autores, onde relatam ter encontrado muita semelhança entre as técnicas de *deep sequencing* (DS) e RT-qPCR. Os potenciais biomarcadores encontrados foram divididos em miRNA oncogênicos (onco-miRNAs) e miRNA supressores de tumor (TS-miRNA). O primeiro grupo inclui: miR-9, miR-10b, miR-19a, miR-96, miR-150 entre outros; já o segundo grupo inclui, mas não está limitado a: miR-1, miR-16, miR-24, miR-101, miR-125b, miR-129 e miR-133a.

GOTTARDO, LIU, *et al.*, 2007, conduziram um trabalho de perfilamento de miRNA em cânceres renais e uroteliais. Foram utilizadas amostras de biópsias de pacientes voluntários, e o perfil de expressão de miRNA foi analisado utilizando-se *microarray*. A pesquisa encontrou um grupo de miRNAs (miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, miR-203, miR-17-5p, miR-23a, and miR-205) que estão todos hiperexpressos no câncer de bexiga, quando em comparação com células uroteliais normais. É interessante destacar que o miR-185 estava hiperexpresso nos dois cânceres estudados, mostrando não possuir especificidade, mas podendo ser um bom biomarcador para o câncer no trato urinário. Da mesma forma, o miR-17-5p, juntamente de seu *cluster* miR-17-92, está desregulado em vários cânceres diferentes. Analisando a relação entre a expressão de miRNA e os estágios da doença, também descobriram que o miR-26b possui a tendência de ser progressivamente menos expresso, conforme o avançar da doença.

CHIYOMARU, ENOKIDA, *et al.*, 2010, investigaram a participação dos miR-145 e miR-133a no câncer de bexiga. Ambos regulam a expressão da proteína homóloga de fascin I (FSCN I), uma proteína estrutural de ligação à actina, responsável por promover protusões na membrana celular e participando da construção de filopódios, sugerindo participação em processos de metástase e invasão tecidual. Foram utilizadas amostras de tecido coletadas de 66 pacientes submetidos a cistectomia ou ressecção transuretral. Foram feitas análises com RT-qPCR, *western blotting*, imunohistoquímicas, hibridização *in situ* e teste de luciferase. Em vários cânceres diferentes, a sobreexpressão de FSCN I está correlacionada com tumores de alto grau, extensiva invasão tecidual, metástase e prognósticos ruins. Confluentemente, o estudo detectou uma forte inibição da proliferação celular em células transfectadas com miR-133a, além de confirmar a hipoexpressão deste miRNA em câncer de bexiga. Células transfectadas com miR-133a e miR-145 também perderam consideravelmente sua capacidade de invasão tecidual. O autor cita três estudos que identificaram um aumento na expressão de FSCN I no câncer de bexiga. Somado a isso, o estudo identificou uma correlação entre a dimensão da sobreexpressão de FSCN I e o estágio tumoral, além da diminuição de viabilidade das células

tumorais submetidas ao *knockdown* do FSCN I. O estudo concluiu que estas são fortes evidências da função oncogênica do FSCN I, e da função de supressão de tumor dos miRNAs em questão, cujo mecanismo está diretamente relacionado com a inibição da expressão de FSCN I.

CAO, WANG, *et al.*, 2019, investigaram a participação do miR-129-5p no câncer de bexiga. A resistência à gemcitabina é um fator complicador importante neste tipo de câncer, e análises de RT-qPCR, citometria de fluxo e viabilidade celular permitiram elucidar a participação deste miRNA na resistência à gemcitabina e seu respectivo mecanismo de ação. Os autores descobriram que uma hipoexpressão do miR-129-5p contribuía para o desenvolvimento de resistência à droga em questão. Além disso, a transfecção de células com miR-129-5p restaurava a sensibilidade celular ao medicamento. A análise mecanística revelou que Wnt5a é o alvo do miRNA, e um *knockdown* deste gene restaura a resistência à gemcitabina.

CHEN, ZENG, *et al.*, 2014, investigaram a participação do miR-200b no câncer de bexiga, mais especificamente na sinalização mediada por fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta$ 1). Este fator de crescimento é um regulador da expressão de metaloproteinase de matriz 16 (MMP-16) e mediador putativo do processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT). Tratamento de cultura de células com fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1, do inglês *transforming growth factor*  $\beta$ 1) *western blotting* e RT-qPCR foram utilizados para obtenção de resultados. Tratamento com o hormônio diminuíram significativamente a expressão de miR-200b, que, por sua vez, foi associado ao MMP-16, através de ferramentas de bioinformática. Essa associação foi confirmada por ensaio repórter da luciferase. O trabalho concluiu que o TGF- $\beta$ 1 induz EMT e à desregulação do MMP-16 via miR-200b, em cânceres de bexiga.

FRIEDMAN, LIANG, *et al.*, 2009, investigaram a participação do miR-101 no câncer, via mecanismos epigenéticos mediados pelo complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2). Este complexo proteico é responsável por metilar resíduos de lisina nas histonas, e é um repressor putativo de genes supressores de tumor. Além disso, os autores fizeram observações superficiais em termos de perfil de expressão de miRNA. O estudo utilizou cultura de células, *microarray*, RT-qPCR, transformação genética, *westerns blotting* e ensaios de luciferase para obter dados. As células analisadas foram linhagens comerciais em comparação com amostras de carcinoma de células transicionais (TCC, do inglês *transitional cell carcinoma*). Estas apresentaram perfis de expressão de miRNA diferenciados, destacando-se: miR-1, miR-101, miR-143, miR-145 e miR-29c como hipoexpressos; e miR-182, miR-183, miR-203, miR-224 e miR-196a como hiperexpressos. Os autores sugerem que o painel de expressão de miRNA observado provavelmente configura uma assinatura de miRNA específica ao TCC. O estudo comprovou, também, que o EZH2, uma subunidade catalítica do PRC2, é um alvo direto do miR-101. Concluiu-se que este miRNA é um importante gene supressor de tumor, pois inibe a expressão de uma proteína supressora de genes supressores de tumor, sendo um potencial biomarcador para o diagnóstico inespecífico de câncer.

LIN, DONG, *et al.*, 2009 investigaram a participação do miR-143 no câncer de bexiga, além de analisar os perfis de expressão de miRNA de tumores de bexiga em comparação a

outras células. Culturas de células, *microarray*, *northern* e *western blotting*, RT-qPCR, ferramentas de bioinformática e transformações genéticas foram realizadas para a condução deste estudo. Em comparação ao grupo controle, haviam 38 miRNAs hipoexpressos e 37 miRNAs hiperexpressos em células cancerosas. Destas, os tumores de bexiga, especificamente, apresentaram 8 miRNAs hipoexpressos: miR-143, miR-145, miR-125a, miR-125b, miR-199, miR-200a, miR-200c e miR-210. Análises estatísticas em quatro *softwares* diferentes indicaram uma sequência na 3' UTR da proteína k-RAS complementar ao miR-143. Esta proteína é um conhecido oncogene envolvido na tumorigênese do câncer de bexiga. O artigo concluiu que foi possível provar que a hipoexpressão de miR-143 é diretamente relacionada com o processo tumoral, pois, células transformadas com indução de sobreexpressão deste gene tiveram seu crescimento inibido.

SONG, ZHANG, *et al.*, 2013 investigaram a participação do miR-708 no câncer de bexiga através da modulação da expressão de caspase-2. Esta é uma enzima importante no processo de apoptose, e sua inibição indevida pode levar à carcinogênese. O estudo utilizou citometria de fluxo, RT-qPCR, ensaio reporter da luciferase e *western blotting* para obtenção de resultados. Foi encontrado que miR-708 estava consideravelmente hiperexpresso em tumores de bexiga, quando em comparação com células normais e até mesmo outros tumores. Isto sugere sua ação como oncogene, o que foi confirmado pela inibição do crescimento em células onde a expressão deste miRNA foi silenciada. Análises mais detalhadas identificaram uma forte associação entre o aumento na expressão de miR-708 e a diminuição da expressão de caspase-2. Os autores concluíram que este miRNA é um bom marcador diagnóstico em potencial, mas acrescenta que seus resultados precisam ser confirmados por estudos sobre sua atuação em outros tumores.

## 5. RESULTADOS

Os artigos incluídos ofereceram um grande volume de dados brutos. Diferentes formas de classificar os tumores de bexiga foram utilizadas pelos autores. Da mesma forma, uma variedade de tipos de amostras e delineamentos metodológicos diferentes foram empregados. Adiante, estes autores são devidamente categorizados para, em seguida, terem seus dados compilados em uma tabela a partir da qual serão discutidos os melhores candidatos a biomarcador em câncer de bexiga.

Cruzando estes resultados, é possível identificar miRNAs que já possuem fortes evidências de seu potencial como biomarcador. A seguir, na **tabela 2**, estão os autores cujos dados foram analisados, bem como seu ano do estudo, delineamento, amostra utilizada, o número de miRNA que foram testados e sua numeração de referência. A numeração de referência será utilizada para identificação dos dados de cada autor na **tabela 3**. Na tabela 3, está a compilação dos dados dos estudos incluídos neste trabalho. A hiperexpressão é denotada pelo sinal de positivo (“+”), e a hipoexpressão, pelo sinal de negativo (“-”). Sobrescrito ao sinal está o número da referência do dado inserido. A numeração das referências se encontra abaixo, e serve como padrão para a numeração usada no preenchimento da tabela.

Tabela 2 Identificação dos estudos incluídos na análise

Nº	Autor	Título do Trabalho	Ano	Delineamento Metodológico	Tipo de Amostra	Nº miRNAs analisados
1	CATTO	Distinct MicroRNA Alterations Characterize High- and Low-Grade Bladder Cancer	2009	Coorte	Biópsias	322
2	FRIEDMAN	The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2	2009	Transversal	Biópsias	1
3	GOTTARDO	Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers	2007	Transversal	Biópsias	368
4	LIN	MicroRNA-143 as a Tumor Suppressor for Bladder Cancer	2009	Transversal	Biópsias	1
5	DYRSKJØT	Genomic Profiling of MicroRNAs in Bladder Cancer: miR-129 Is Associated with Poor Outcome and Promotes Cell Death In vitro	2009	Transversal	Biópsias	290
6	MENGUAL	Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer	2013	Coorte	Urina	40
7	ZHANG	Cell-Free Urinary MicroRNA-99a and MicroRNA-125b Are Diagnostic Markers for the Non-Invasive Screening of Bladder Cancer	2014	Transversal	Urina	955
8	LUO	lncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150	2018	Transversal	Plasma	1
9	JIANG	Serum microRNA expression signatures identified from genome-wide microRNA profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer	2015	Coorte	Soro	529
10	CHEN	Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition and increased expression of matrix metalloproteinase-16 via miR-200b downregulation in bladder cancer cells	2014	<i>in vitro</i>	Cultura de Células	1

Fonte: Autoria Própria

Abaixo, está uma tabela com os dados destes autores, compilados e comparados. Células verdes indicam hiperexpressão, células vermelhas indicam hipoexpressão, e células amarelas indicam incongruências. É importante ressaltar que muitas classificações diferentes foram usadas, entre os autores. Alguns classificaram os tumores em invasivos e não invasivos, outros em alto e baixo grau, outros pelo sistema da OMS (Ta-T4 e CIS); além disso, alguns estudos de coorte incluíram tumores em progressão em suas classificações. O modelo seguido por esta tabela é o preconizado pela OMS (Ta-T4 e CIS).

Tabela 3 Expressão de miRNA por estágio tumoral. A hiperexpressão é denotada pelo sinal de positivo (“+”) e pela cor verde, e a hipoexpressão, pelo sinal de negativo (“-”) e a cor vermelha. Incongruências são identificadas pela cor amarela.

miRNA / Estágio	Ta	T1	T2a	T2b	T3	T4	CIS
miR-1	-1	-1					
miR-100	-1	-1	-1				
miR-101	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2
miR-103-1	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
miR-106a	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
miR-107							+1
miR-125a	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
miR-125b	-1/-4 -5/-6/-7						
miR-126	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
miR-126*	-5/+6	-5/+6	-5/+6	-5/+6	-5/+6	-5/+6	-5/+6
miR-129-5p			+5	+5	+5	+5	+5
miR-130b			+1	+1	+1	+1	
miR-133a	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
miR-133b	-1/+6	-1/+6	-1/+6	-1/+6	-1/+6	-1/+6	-1/+6
miR-135b	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

miRNA / Estágio	Ta	T1	T2a	T2b	T3	T4	CIS
miR-140-5p	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-142-3p	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-142-5p	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-143	-1/-4	-1/-4	-1/-4	-4/-5	-4/-5	-4/-5	-4/-5
	-5/-6	-5/-6	-5/-6	-6	-6	-6	-6
miR-145	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
	-5/-6	-5/-6	-5/+6	-5/+6	-5/+6	-5/+6	-5/-6
miR-147							+1
miR-148a	+6	+6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-149	+6	+6	+6	+6	+6	+6	+6
miR-15a							+1
miR-150	-4/-8	-4/-8	-4/-8	-4/-8	-4/-8	-4/-8	-4/-8
miR-152	-1	-1	+9	+9	+9	+9	
miR-17-5p	+3/+4	+3/+4	+3/+4	+3/+4	+3/+4	+3/+4	+3/+4
miR-183	+6	+6	+6	+6	+6	+6	+6
miR-184	+5	+5	+1/+5	+1/+5	+1/+5	+1/+5	+5
miR-185	+3/+5	+3/+5	+3/+5	+3/+5	+3/+5	+3/+5	+3/+5
miR-187	+6	+6	+6	+6	+6	+6	+6
miR-18a*	+6	+6	+6	+6	+6	+6	+6
miR-19	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
miR-193a	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
miR-193a	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4

miRNA / Estágio	Ta	T1	T2a	T2b	T3	T4	CIS
miR-193a-3p	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-195	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5
miR-198	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-199b	-4	-4	-4	-4	-4	-4	-4
miR-200b	+1/+6	+1/+6	+1/-6	-6/-10	-6/-10	-6/-10	-6/-10
miR-200c	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
miR-203	+3	+3	-5/+3	-5/+3	-5/+3	-5/+3	+3
miR-204	-1/+6	-1/+6	-1/-6	-1/-6	-1/-6	-1/-6	-1/-6
miR-205	+3/-6	+3/-5 _6	+3/-5 _6	+3/-5 _6	+3/-5 _6	+3/-5 _6	+3/-5 _6
miR-20a	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-21	+5	+5	+1/+5	+1/+5	+1/+5	+1/+5	+1/+5
miR-210	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
miR-211	+1	+1					+1
miR-214	-1	-1					
miR-218	-1	-1					
miR-221	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4
miR-223	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
miR-23a	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
miR-23b	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4	+3/-4
miR-25	+4/-6	+4/-6	+4/-6	+4/-6	+4/-6	+4/-6	+4/-6
miR-26a	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5
miR-26b	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3

miRNA / Estágio	Ta	T1	T2a	T2b	T3	T4	CIS
miR-27a*	_6	_6	_6	_6	_6	_6	_6
miR-27a-3p				_9	_9	_9	_9
miR-299-3p	_1	_1	_1				
miR-29a	_6	_6	_6	_6	_6	_6	_6
miR-29b			_5	_5	_5	_5	
miR-29c	_5	_5	_5	_5	_5	_5	_5
miR-302b	_5	_5	_5	_5	_5	_5	_5
miR-30-5p	_4	_4	_4	_4	_4	_4	_4
miR-30a-3p	_1	_1					
miR-31	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4/-5
miR3187-3p			_9	_9	_9	_9	
miR-32							+1
miR-320a	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-324-5p	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
miR-338-3p	_6	_6	_6	_6	_6	_6	_6
miR-361-5p			_5	_5	_5	_5	
miR-373	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
miR-373*	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-375	+6	+6	_6	_6	_6	_6	_6
miR-376a	_1	_1					
miR-380-5p	_1	_1	_1	_1	_1	_1	_1
miR-382							_6

miRNA / Estágio	Ta	T1	T2a	T2b	T3	T4	CIS
miR-383	-1	-1					
miR-411	-1	-1					
miR-424	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-429	+1	+1					
miR-449b			+1	+1	+1	+1	+1
miR-450a	-6	-6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-451							+5
miR-455-5p	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5
miR-483-3p							+5
miR-489	-5	-5	-5	-5	-5	-5	-5
miR-492	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-498	-5	-5	-5	+5	+5	+5	+5
miR-503	-1/-5	-1/-5	+1/+5	+1/+5	+1/+5	+1/+5	+1
miR-507	-1	-1					
miR-510	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-512-3p							+1
miR-517c			+1	+1	+1	+1	+1
miR-518e	+1	+1					+1
miR-518*	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-519e*	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5
miR-520c							+1
miR-520d	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
miR-549	-1	-1	-1				+1

miRNA / Estágio	Ta	T1	T2a	T2b	T3	T4	CIS
miR-564			+1	+1	+1	+1	
miR-566			+1	+1	+1	+1	
miR-569			+1	+1	+1	+1	
miR-572			+1	+1	+1	+1	+1
miR-591	+1	+1	+1				
miR-600	+1	+1					
miR-601			+1	+1	+1	+1	+1
miR-622			+1	+1	+1	+1	+1
miR-627			+1	+1	+1	+1	
miR-639			+1	+1	+1	+1	+1
miR-644			+1	+1	+1	+1	+1
miR-646			+1	+1	+1	+1	+1
miR-649			+1	+1	+1	+1	+1
miR-659	+1	+1	+1				
miR-9							+1
miR-92							+1
miR-92a	-6	-6	+6	+6	+6	+6	+6
miR-93	+4	+4	+1/+4	+1/+4	+1/+4	+1/+4	+1/+4
miR-95	+6	+6	-6	-6	-6	-6	-6
miR-96			+1	+1	+1	+1	+1
miR-99a	-1/-8	-1/-8	-1/-8	-8	-8	-8	-8

Fonte: Autoria Própria

Ao inserir os dados brutos das bibliografias estudadas na tabela, muitos miRNA se destacaram pela congruência ou incongruência de resultados de diferentes autores. A partir de algumas incongruências, foram identificados desvios metodológicos que levaram à invalidação dos resultados de dois autores.

Apesar disso, seus resultados estão mantidos na tabela, assim como as congruências e incongruências que criaram, pois, a invalidação foi posterior à análise dos dados obtidos destes estudos. Abaixo, é oferecida uma breve discussão acerca destes fenômenos, e serão levantadas hipóteses que os justifiquem.

### **Incongruências**

**miR-31:** Ambos autores fizeram estudos coesos que não se enquadraram em nenhum critério de exclusão. Contudo, apresentam resultados contraditórios quanto à alteração da expressão de miR-31. Por um lado, DYRSKJØT detectou hipoexpressão exclusiva a tumores de alto grau, por outro, LIN detectou hiperexpressão inespecífica. Estes resultados são incompatíveis, de modo que o miR-31 foi considerado como um candidato ruim a biomarcador.

**miR-126\*:** Ambos autores conduziram estudos coesos, sem atenderem a critérios de exclusão. Apesar dos resultados aparentemente confiáveis, se contradizem no que concerne à expressão do miR-126\*. Por um lado, DYRSKJØT encontrou o miR-126\* hipoexpresso em todos os fenótipos, enquanto MENGGUAL o encontrou hiperexpresso em todos os fenótipos.

Nestes dois primeiros casos, onde resultados contraditórios foram relatados por autores cujos trabalhos não apresentaram desvios e levantassem desconfiança, é possível considerar diferenças étnicas, nutricionais ou culturais que justifiquem estas diferenças. SHIMIZU, SUZUKI, *et al.*, 2012, investigaram fatores epigenéticos por trás da expressão de miRNA em tumores de bexiga e identificaram padrões de metilação diferenciados em pacientes com diferentes prognósticos.

Além dos fatores citados, quaisquer diferenças relacionadas ao local onde as amostras foram obtidas levam a grandes diferenças no ponto de vista epigenético. Composição do ar, temperatura, variação térmica, umidade, pressão atmosférica, acesso a água tratada, consumo de alimentos industrializados, o estresse, poluição e animais de estimação são apenas alguns exemplos das coisas que alteram nossa expressividade genética, e podem afetar os mecanismos moleculares do câncer.

**miR-133b:** A aparente discordância se dá em decorrência das diferentes categorizações a que os dados da tabela foram submetidos. DYRSKJØT, em seu estudo transversal, não detectou o miR-133b como diferencialmente expresso em câncer de bexiga com relação ao tecido normal, nem em tumores de alto grau, com relação aos de baixo grau. Também não o detectou como hipoexpresso, contradizendo os outros autores. Contudo, DYRSKJØT detectou a hiperexpressão de miR-133b em tumores em progressão, ou seja, que vieram a assumir fenótipos mais agressivos após a coleta das amostras.

Já ICHIMI e CATTO detectaram o miR-133b hipoexpresso em tumores de bexiga. Além disso, ambos estudos eram de coorte, o que torná-los-ia mais confiáveis. ICHIMI, inclusive, analisou inicialmente 22 amostras e, depois, conduziu estudos confirmatórios com 135 amostras, que corroboraram para os achados anteriores. Apesar disso, é controverso ICHIMI não ter detectado expressão diferencial de miRNA em diferentes estágios tumorais.

Tendo uma maioria de autores relatando experiências que apontavam para a expressão diferencial de miRNA em diferentes estágios tumorais, os resultados de ICHIMI se tornam inconsistentes com a bibliografia, de modo que o estudo não será incluído nas discussões que se seguirão. Com isso, as incongruências presentes nos miR-9 e miR-223 são resolvidas.

Por outro lado, CATTO conduziu um estudo de coorte coeso, sem resultados contraditórios ou falhas metodológicas que levantassem dúvidas. Por isso, os resultados controversos fazem de miR-133b um candidato ruim a biomarcador, e ainda precisa ser investigado melhor para ser considerado viável.

**miR-145:** A presença de dados aparentemente contraditórios oriundos dos estudos de DYRSKJØT são explicados pelas diferentes categorizações a que os dados foram submetidos em seu trabalho. Em uma análise, ele detectou o miR-145 hipoexpresso em tumores de bexiga. Apesar disso, ele detectou hiperexpressão deste miRNA em tumores em progressão.

Por outro lado, LIN apresenta um estudo transversal coeso, onde foi realizado um perfilamento preliminar da expressão de miRNA, não estágio-específico, e, em seguida, uma análise mais aprofundada do miR-143. O miR-145 foi o miRNA cuja alteração de expressão se apresentou mais acentuada (Fold médio = -15,9 com DP = 9,06).

Os dados de DYRSKJØT e LIN são coerentes entre si, e a aparente discordância é oriunda da possibilidade de o miR-145 estar hiperexpresso, exclusivamente, em tumores em progressão. Em seu trabalho, DYRSKJØT também relata ter detectado miR-145 hipoexpresso em tumores, com relação ao tecido normal, e até mesmo como sendo aquele com a alteração de expressão mais acentuada dos miRNAs analisados. Ademais, no estudo de DYRSKJØT, o miR-145 não apresentou expressão diferencial entre tumores de alto e baixo grau.

Estes dados fazem do miR-145 um bom biomarcador em potencial, cujo papel na progressão tumoral precisa ser investigado mais detalhadamente. Estudos independentes encontraram-no acentuadamente hipoexpresso, não apenas no câncer de bexiga, mas em outros tipos de câncer, como o câncer de mama, próstata e cólon. Dessa forma, ele se torna um bom biomarcador em potencial para o câncer, mas sem especificidade para o carcinoma de células uroteliais, e um bom biomarcador prognóstico, evidenciando o agravar da doença.

**miR-152:** Em seu estudo transversal, JIANG incluiu um número considerável de pacientes, se comparado aos outros estudos analisados, contando com 250 pacientes de câncer urotelial, e 240 controles. Seu estudo é bem sistematizado e gera dados confiáveis. Com base no perfilamento de miRNA diferencialmente expresso em tecidos normais e cancerosos, o miR-152 foi escolhido para compor um painel de 6 miRNAs que, segundo os autores, representariam um bom painel diagnóstico. O estudo destaca que a hiperexpressão de miR-152 estava, em

citação direta: “[...] significativamente correlacionada com o estágio avançado do tumor.” (JIANG, DU, *et al.*, 2015, p.857).

JIANG utilizou de diferentes abordagens estatísticas para confirmar seus resultados. Apesar de detectar a hiperexpressão do miRNA em tumores de alto grau, não apontou hipoexpressão do miR-152 em tumores de baixo grau. Em contrapartida, CATTO encontrou o miR-152 hipoexpresso apenas em tumores de baixo grau, mas não detectou expressão diferencial em tumores de alto grau. Apesar de encontrarem resultados aparentemente complementares, para realmente o serem, os autores deveriam ter encontrado, também, o resultado encontrado pelo outro. Com isso, o miR-152 é um candidato a biomarcador que mostra um bom potencial. Hipoteticamente, poderia não apenas diagnosticar o câncer de bexiga com especificidade, como também expor o grau de estadiamento da doença. Mas, para isso, é necessário estudá-lo mais aprofundadamente.

**miR-200b:** CATTO o encontrou hipoexpresso em tumores de baixo grau, contudo, CHEN, em suas análises não estágio-específicas, declarou ter encontrado o miR-200b hiperexpresso. Esta contradição é explicada pela função metabólica do miR-200b, pois, CHEN comprovou que o miR-200b atua como um oncogene, regulando a expressão de TGF-beta1, o que promove a invasão tecidual e metástase, sendo natural que esteja hiperexpresso exclusivamente em tumores invasivos e hipoexpresso em tumores de baixo grau; isto faz dele um bom candidato a biomarcador com potencial para identificação do estágio tumoral.

**miR-203:** Apesar do número relativamente pequeno de amostras (25 pacientes de tumor de bexiga e 2 controles), quando comparado aos outros estudos, GOTTARDO conduziu um estudo transversal aparentemente coeso e com resultados hipoteticamente aceitáveis. Apesar disso, DYRSKJØT relata resultados contrários aos de GOTTARDO.

DYRSKJØT detectou que o miR-203 está hipoexpresso em MIBC em relação aos NMIBC, além de estar hipoexpresso em NMIBC de alto grau. Totalmente contrários a isso, estão os resultados de GOTTARDO, que relata uma hiperexpressão inespecífica com relação ao estágio tumoral.

GOTTARDO cita referências que indicam a hiperexpressão dos miRNAs estudados por ele em cânceres diferentes dos de bexiga, e faz um estudo de perfis de expressão de miRNA não estágio específica com amostras de bexiga e rim. Ademais, GOTTARDO utilizou, para a análise quantitativa de miRNA, em citação direta: “um microchip de oligonucleotídeos para perfilamento de micro-RNA desenvolvido em nossos laboratórios” (GOTTARDO, 2007, p.387).

O delineamento e condução deste estudo, somado aos resultados contraditórios citados anterior e posteriormente a este, levantam dúvidas sobre a validade dos resultados de GOTTARDO, de modo que seu estudo também foi desconsiderado. Ao excluir os resultados de GOTTARDO do estudo, as incongruências presentes nos miR-221, e miR-23b são resolvidas, e a presente no miR-205 fica apenas entre MENGUAL e DYRSKJØT.

Muitas das bibliografias incluídas neste trabalho consideram o miR-203 um candidato a biomarcador importante. Contudo, ele precisa ser investigado por mais autores, para que os dados formem um arcabouço argumentativo coeso em favor do seu correto uso diagnóstico.

**miR-204:** Resultados contraditórios de estudos que não atenderam aos critérios de exclusão serão discutidos após as análises individuais das incongruências. Contudo, é importante citar que os dados dos autores são congruentes quanto à hipoexpressão do miR-204. Ambos estudos fizeram análises estágio específicas. Um fator que pode ter contribuído para a incongruência é a diferente forma de classificar os tumores de bexiga. Em ambos os casos, os resultados levaram à conclusão de que haviam miR-204 diferencialmente expressos entre NMIBC de baixo e alto graus. Contudo, MENGUAL detectou hiperexpressão em NMIBC de baixo grau, resultados contrários aos de CATTO, levantando dúvida sobre a validade de ambos.

Apesar disso, a expressão diferencial de miR-204 em câncer de bexiga parece comprovada. Resta avaliar sua especificidade ao carcinoma urotelial, e elucidar sua expressão diferencial em NMIBC de baixo grau, já que sua hipoexpressão nos outros fenótipos é um consenso entre os autores.

**miR-205:** Em suas análises, DYRSKJØT concluiu que o miR-205 está diretamente correlacionado com o progresso tumoral, estando especialmente hipoexpresso em tumores de alto grau associados a CIS. MENGUAL corrobora para isso, expondo uma crescente hipoexpressão de miR-205 conforme o aumento do grau do tumor.

Com isso, ainda resta comprovar definitivamente os resultados de DYRSKJØT e MENGUAL, para que o miR-205 se torne um bom biomarcador, com capacidade prognóstica, como os autores demonstram ser possível.

**miR-223:** O miR-223 foi desconsiderado como potencial biomarcador, pois, ambos autores que o investigaram foram excluídos do trabalho. Contudo, ainda há bibliografias que o apontam como um biomarcador em potencial, e os resultados de expressão diferenciada dele nos tumores de bexiga, por mais que contraditórios, não devem ser totalmente ignorados. O miR-223 deve ser mais investigado para, talvez, contribuir para a melhora no processo de diagnóstico de câncer de bexiga.

**miR-25:** A aparente contradição quanto à hipoexpressão do miR-25 em tumores de baixo grau se justifica pelo fato de LIN ter feito uma análise não-estágio específica. Em seu estudo, MENGUAL confirma os resultados de LIN, detectando uma média geral de hiperexpressão do miR-25 em tumores de bexiga. Sua análise mais detalhada revelou que o miR-25, na verdade, está um pouco hipoexpresso em tumores de baixo grau, e bastante hiperexpresso em tumores de alto grau, o que levou LIN a detectar uma hiperexpressão inespecífica.

Isso permite considerar o miR-25 um bom biomarcador em potencial para o câncer de bexiga, e com bom potencial de avaliação prognóstica. Para usá-lo desta forma, resta confirmar os resultados de MENGUAL e LIN com mais dados.

## **Congruências**

Em muitos casos, foi possível observar estudos independentes obtendo resultados semelhantes, as congruências. São desconsideradas as congruências geradas pelos dados de autores que foram invalidados. Além disso, dentre as congruências válidas, existem situações aparentemente sinérgicas, que na verdade são inconsistências entre os resultados, semelhantes às incongruências relatadas acima.

Um exemplo disto é o miR-184, que estava hiperexpresso em tumores invasivos, segundo DYRSKJØT, e hiperexpresso em todos os fenótipos, segundo CATTO. Ambos autores fizeram análises estágio específicas, de modo que estes resultados, na verdade, são contraditórios.

Apesar de algumas apresentarem diferenças assim, quando a análise particularizada evidencia sinergia, as congruências se tornam as evidências mais sólidas da participação de alguns miRNA nos tumores de bexiga, restando apenas, na maioria dos casos, confirmar sua especificidade ao câncer de bexiga, em relação a outras neoplasias.

## **6. CONCLUSÕES**

A partir da interpretação dos dados analisados, fica evidente a participação do miRNA no processo tumorigênico, e sua capacidade de identificar tumores diferentes, e até mesmo enquadrá-los com fidedignidade ao grau de agressividade correto. De todos os miRNA analisados, foi selecionado um grupo constituído por aqueles que apresentaram maior potencial para desempenhar a função de biomarcador.

O potencial de um biomarcador foi avaliado com base em sua especificidade ao câncer de bexiga ou aos estágios tumorais. Além disso, o potencial de um biomarcador também foi mensurado pela quantidade de autores diferentes que concordaram em suas conclusões.

Os miRNAs que, após a análise dos dados, foram considerados bons candidatos a biomarcador são: miR-125b, miR-143, miR-150, miR-503, miR-93, miR-145 e miR-200b. Todos estes miRNA precisam ser analisados mais detalhadamente, mas merecem atenção especial por sua capacidade de identificação do tumor de bexiga, em detrimento de outros tumores e/ou do grau de diferenciação e invasão tecidual.

Através da análise bibliográfica sistematizada, foi possível compilar diferentes resultados que, em última análise, comporão o banco de dados de miRNA. Muitas são as limitações e desafios até o desenvolvimento de uma técnica de rotina para diagnóstico precoce de miRNA.

Apesar disso, já é possível abordar o tema com mais otimismo. Com novos estudos sendo feitos, mais se elucidará acerca do perfil de expressão de microRNA de cada tipo de câncer, e o diagnóstico diferencial e precoce poderá ser cada vez mais preciso.

Um desafio importante é o desenvolvimento de uma ferramenta de *software* que promova a interpretação das dosagens de centenas de miRNA por amostra, cruzando os resultados com referências de um banco de dados.

## 7. BIBLIOGRAFIA

**miRBase**. Disponível em: <<https://www.mirbase.org/>>. Acesso em: 15 dez. 2022.

ALMEIDA, Tamires C. et al. Antiproliferative and Toxicogenomic Effects of Resveratrol in Bladder Cancer Cells With Different TP53 Statu. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Ouro Preto, 2019.

BARTEL, David P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. **Cell Press**, 23 Jan 2004. 281-297.

BEHRENDT, Mark et al. Bladder Cancer. **EAU Patient Information**, 2020. Disponível em: <<https://patients.uroweb.org/cancers/bladder-cancer/>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

CAO, Jingyi et al. miR-129-5p inhibits gemcitabine resistance and promotes cell apoptosis of bladder cancer cells by targeting Wnt5a. **International Urology and Nephrology**, Xuzhou, Jiangsu, 16 ago. 2019. 1811-1819.

CATTO, James W. F. et al. Distinct MicroRNA Alterations Characterize High- and Low-Grade Bladder Cancer. **Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics**, 01 nov. 2009. 8472-8481.

CHA, Jonathan D.; LOURENÇO, Danilo B.; KORKES, Fernando. Analysis of the association between bladder carcinoma and arsenic concentration in soil and water in southeast Brazil. **International Brazilian Journal of Urology**, São Paulo, 20 jun. 2018. 906-913.

CHEN, MIN F. et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces epithelial-mesenchymal transition and increased expression of matrix metalloproteinase-16 via miR-200b downregulation in bladder cancer cells. **MOLECULAR MEDICINE REPORTS**, 2014. 1549-1554.

CHIN, Lena J. et al. A SNP in a let-7 microRNA Complementary Site in the KRAS 3' Untranslated Region Increases Non-Small Cell Lung Cancer Risk. **American Association of Cancer Research**, out. 2008. 7.

CHIYOMARU, T et al. miR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. **British Journal of Cancer**, 16 fev. 2010. 883-891.

COLOMBO, Jucimara; RAHAL, Paula. A tecnologia de microarray no estudo do câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, março 2010. 64-72.

DA COSTA, Walter H. et al. **DIRETRIZES Guia de Bolso uma referência rápida para os urologistas**.

DEGEORGE, Katharine C.; HOLT, Harry R.; HODGES, Stephanie. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, 15 out. 2017. 9.

DEGLIANGELI, Federica; POMPA, Pier P.; FIAMMENGO, Roberto. Nanotechnology-Based Strategies for the Detection and Quantification of MicroRNA. **Chemistry A European Journal**, 2014. 17.

DING, Cuimin et al. A miR-SNP of the XPO5 gene is associated with advanced non-small-cell lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, 12 ago. 2018. 5.

DYRSKJØT, Lars et al. Genomic Profiling of MicroRNAs in Bladder Cancer: miR-129 Is Associated with Poor Outcome and Promotes Cell Death In vitro. **Cancer Research**, 01 jun. 2009. 4851-4860.

ENOKIDA, Hideki et al. The role of microRNAs in bladder cancer. **Investigative and Clinical Urology**, Kagoshima, Japão, 2016. 60-76.

FIAMMENGO, Roberto. Can nanotechnology improve cancer diagnosis through miRNA detection? **Biomarkers in Medicine**, 05 dez. 2016. 18.

FREEDMAN, Neal D. et al. Association Between Smoking and Risk of Bladder Cancer Among Men and Women. **JAMA**, 2011. 9.

FRIEDMAN, Jeffrey M. et al. The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2. **American Association for Cancer Research Journals**, Los Angeles, 15 março 2009. 2623-2629.

GERENCIMENTO de rsicos para cadeia do frio. **Boas Praticas**, 2017. Disponível em: <<http://boaspraticasnet.com.br/gerenciamento-de-riscos-para-cadeia-do-frio/>>. Acesso em: 08 dez. 2022.

GOTTARDO, Fedra et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 30 jan. 2007. 387–392.

GRAHAM, Trevor A.; SOTTORIVA, Andrea. Measuring cancer evolution from the genom. **Journal of Pathology**, London, 18 nov. 2016. 183-191.

HAYES, Josie; PERUZZI, Pier P.; LAWLER, Sean. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, Boston, ago. 2014. 10.

HUMPHREY, Peter A. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. **European Association of Urology**, 2016. 14.

HUNG, Jui-Hung; WENG, Zhiping. Analysis of Microarray and RNA-seq Expression Profiling Data. **Cold Spring Harbor Protocol**, 29 Agosto 2016.

- ICHIMI, Takahiro et al. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. **International Journal of Cancer**, Kagoshima, 23 fevereiro 2009. 345-352.
- IORIO, Marilena; CROCE, Carlo. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Molecular Medicine**, Columbus, 2012. 17.
- JIANG, Xiumei et al. Serum microRNA expression signatures identified from genome-wide microRNA profiling serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence of bladder cancer. **International Journal of Cancer**, Shandong Province, 2015. 854–862.
- JÚNIOR, Archimedes N.; DOS REIS, Rodolfo B.; CAMPOS, Rodrigo S. M. **MANU Manual de Urologia**.
- KAPPEL, Andreas; KELLER, Andreas. miRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. **Clin Chem Lab Med**, 2016.
- KIM, V N. MicroRNA BIOGENESIS: COORDINATED CROPPING AND DICING. **NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY**, maio 2005. 10.
- KONG, W et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. **Nature**, Tampa, FL, EUA, 28 jan. 2013. 679-689.
- KORKES, Fernando; MALUF, Fernando. Increasing costs from bladder cancer in the Brazilian Health System: the role of establishing public health policies. **International Brazilian Journal of Urology**, São Paulo, abr. 2021. 443-447.
- LENIS, Andrew T.; LEC, Patrick M.; CHAMIE, Karim. Bladder Cancer: A Review. **JAMA**, 2020. 12.
- LI, Yi et al. Non-coding RNA in bladder cancer. **Cancer Letters**, Beijing, 24 abr. 2020. 38-44.
- LI, Yu; KOWDLEY, Kris V. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. **Analytical Biochemistry**, Seattle, 11 set. 2012. 69-75.
- LIN, Tianxin et al. MicroRNA-143 as a Tumor Suppressor for Bladder Cancer. **Journal of Urology**, Guangzhou, março 2009. 1372-1380.
- LUO, Huarong et al. lncRNA CASC11 promotes cancer cell proliferation in bladder cancer through miRNA-150. **Journal of Cellular Biochemistry**, Shanghai, 6 dez. 2018. 1-7.
- MANTEROLA, Lorea et al. A small noncoding RNA signature in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool. **Neuro-Oncology**, 16 jan. 2014. 8.
- MATULAY, Justin T.; KAMAT, Ashish M. Advances in risk stratification of bladder cancer to guide personalized medicine. **F1000 research**, 25 jul. 2018. 13.

- MENGUAL, Lourdes et al. Using microRNA profiling in urine samples to develop a non-invasive test for bladder cancer. **International Journal of Cancer**, Barcelona, novembro 2013. 2631-2641.
- MITCHELL, Patrick S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **PNAS**, 29 jul. 2008. 6.
- NEELY, Lori A. et al. A single-molecule method for the quantitation of microRNA gene expression. **Nature Methods**, 2006.
- PETERS, Jeffrey M.; GONZALEZ, Frank J. The Evolution of Carcinogenesis. **Society of Toxicology**, Bethesda, 2018. 272-276.
- RANI, Sweta; VISHNOI, Anchal. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. **MicroRNA Profiling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, 2017. 10.
- RUPAIMOOLE, Rajesha; SLACK, Frank. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews | Drug Discovery**, Boston, 17 fev. 2017. 19.
- SANDHU, Sukhinder K. et al. B-cell malignancies in microRNA E $\mu$ -miR-17~92 transgenic mice. **PNAS**, 05 nov. 2013. 6.
- SANLI, Oner et al. Bladder Cancer. **Nature Reviews**, Dallas, 13 abril 2017.
- SARASIN, Alain. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. **Elsevier**, Villejuif, 24 jun. 2003. 99-106.
- SHARP, Victoria J.; BARNES, Kerri T.; ERICKSON, Bradley A. Assessment of Asymptomatic Microscopic Hematuria in Adults. **American Family Physician**, Iowa, 01 dez. 2013. 747-754.
- SHIMIZU, Takashi et al. Methylation of a Panel of MicroRNA Genes Is a Novel Biomarker for Detection of Bladder Cancer. **European Association of Urology**, Tokyo, 23 novembro 2012. 1091-1100.
- SILVA, Glenda N. et al. Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. **Experimental Biology and Medicine**, Ribeirão Preto, 2010. 814-824.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Diretrizes: Guia de Bolso, uma referência rápida para os urologistas, 2017. 273.
- SOLOMON, James P.; HANSEL, Donna E. The Emerging Molecular Landscape of Urothelial Carcinoma. **Surgical Pathology Clinics**, 2016.

SONG, Tao et al. miR-708 promotes the development of bladder carcinoma via direct repression of Caspase-2. **J Cancer Res Clin Oncol** (, 09 abr. 2013. 1189–1198.

STAHLHUT, Carlos; SLACK, Frank J. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. **Genome Medicine**, New Haven, 2013. 12.

WEINBERG, Robert A. How cancer arises. **Scientific American**, set. 1996. 62-70.

WU, Yuan et al. A miR-200b/200c/429-Binding Site Polymorphism in the 3' Untranslated Region of the AP-2a Gene Is Associated with Cisplatin Resistance. **PLoS ONE**, dez. 2011. 5.

ZHANG, Ding-Zuan et al. Cell-Free Urinary MicroRNA-99a and MicroRNA-125b Are Diagnostic Markers for the Non-Invasive Screening of Bladder Cancer. **Plos One**, Hong Kong, 11 julho 2014.