

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
Domeniul Medicină**



*Studiul profilului micro-ARN la pacienții cu
cistectomie radicală pentru carcinom urotelial
vezical*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător științific:

ACADEMICIAN SINESCU IOANEL

Doctorand:

Dr PETCU COSTIN

**BUCUREȘTI
2021**

CUPRINS

LISTA CU LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

LISTA CU ABREVIERI

INTRODUCERE

PARTEA GENERALĂ

- STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU -	1
1. NOȚIUNI GENERALE	1
1.1 Generalități – Clasificarea TNM a carcinomului urotelial vezical	1
1.2 Factori de risc și epidemiologie	3
1.3 Diagnostic	7
2. ASPECTE ANATOMO-PATOLOGICE ALE CARCINOMULUI UROTELIAL VEZICAL	10
3. TRATAMENTUL CARCINOMULUI UROTELIAL VEZICAL	16
3.1 Tratamentul endoscopic	16
3.2 Recidiva și progresia bolii după tratamentul endoscopic	19
3.3 Chimioterapie intravezicală	22
3.4 Imunoterapie intravezicală cu BCG	24
3.5 Tratamentul neoadjuvant	27
3.6 Cistectomia radicală	31
3.7 Tratamentul carcinomului urotelial vezical musculo-invaziv cu prezervarea vezicii urinare	40
3.8 Tratamentul adjuvant	44
3.9 Tratamentul pacienților aflați în stadiul metastatic	46
4. ASPECTE GENETICE ȘI BIO-MOLECULARE ALE CARCINOMULUI UROTELIAL VEZICAL	52
5. URMĂRIREA PACIENȚILOR CU CARCINOM UROTELIAL VEZICAL	61
6. PROGNOSTICUL PACIENȚILOR CU CARCINOM UROTELIAL TRATAȚI PRIN CISTECTOMIE RADICALĂ	64
7. MARKERI MOLECULARI AI CARCINOMULUI UROTELIAL VEZICAL	67

PARTEA SPECIALĂ	
- CONTRIBUȚII PERSONALE -	69
8. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE	69
9. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII	71
10. STUDIUL NR 1 – ANALIZA FACTORILOR CLINICI ȘI BIOLOGICI CE INFLUENȚEAZĂ SUPRAVIEȚUIREA PACIENȚILOR CU CARCINOM UROTELIAL VEZICAL TRATAȚI PRIN CISTECTOMIE RADICALĂ	79
10.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiectivele specifice)	79
10.2 Materiale și metode	79
10.3 Rezultate	81
10.4 Discuții	118
11. STUDIUL NR 2 – ANALIZA PROFILULUI MICRO-ARN LA PACIENȚII CU CISTECTOMIE RADICALĂ PENTRU CARCINOM UROTELIAL VEZICAL	125
11.1 Introducere (ipoteza de lucru și obiectivele specifice)	125
11.2 Materiale și metode	126
11.3 Rezultate	127
11.4 Discuții	145
12. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	153
BIBLIOGRAFIE	158
ANEXE	

INTRODUCERE

Carcinomul urotelial vezical (CUV) este unul dintre cele mai des întâlnite tipuri de neoplazii, fiind într-o continuă creștere a incidenței pe mapamond, dar cu o tendință de scădere a mortalității datorată progresului realizat în medicina modernă. Din cauza prevalenței crescute, este o problemă majoră de sănătate publică prin costurile realizate de diagnosticul, tratamentul și monitorizarea pacienților cu astfel de boală.

Utilizarea pe scară largă a ultrasonografiei a dus la diagnosticarea mai rapidă a acestei afecțiuni, majoritatea pacienților prezentându-se la medic pentru hematurie sau sindrom vezical. Mai mult, creșterea accesibilității pacienților la metode de înaltă performanță în diagnosticul imagistic al tumorilor vezicale, precum tomografia computerizată (TC) sau rezonanța magnetică (IRM), a dus la stabilirea unui diagnostic timpuriu, a unei indicații terapeutice corecte și, consecutiv, la îmbunătățirea prognosticului pacientului diagnosticat cu CUV.

În cazul în care este diagnosticat în stadiile incipiente, acesta este unul dintre puținele tipuri de cancer ce se poate trata și prin metode chirurgicale minim-invazive care presupun excizia tumorii endovezicale, fără a necesita excizia întregului organ sau a unui întreg perete vezical. Totuși, în țările în care medicina primară este insuficient reprezentată, există destul de mulți pacienți care sunt diagnosticați cu CUV în stadii avansate, ce presupun excizia parțială sau totală a vezicii urinare, încă de la prima prezentare la medicul urolog. Nu există în acest moment, un marker diagnostic sau prognostic al CUV, care să fie standardizat și utilizat în screening-ul sau urmărirea pacienților cu tumori vezicale.

Cistectomia radicală (CR) este o intervenție chirurgicală recomandată unui procent semnificativ dintre pacienții diagnosticați cu CUV, în cursul evoluției lor neoplazice. CR este o intervenție chirurgicală complexă, ce supune pacientul unui risc relativ crescut de apariție a incidentelor intraoperatorii și a complicațiilor postoperatorii. Ratele de supraviețuire la 5 ani postoperatoriu pentru pacienții aflați în stadii local-avansate, metastatice sau cu ganglioni loco-regionali pozitivi, sunt relativ mici. Stabilirea unor factori de risc capabili să prezică evoluția postoperatorie a pacienților este utilă pentru a identifica pacienții ce pot beneficia în urma intervenției chirurgicale radicale.

Managementul unui pacient diagnosticat cu CUV se bazează, în principal, pe datele din raportul histo-patologic. Având în vedere că aceste rapoarte pot fi subiectul unor erori și al unor

interpretări variabile în funcție de medicul anatomic-patolog care analizează piesa, este necesară identificarea unor biomarkeri complementari ce ar putea întregi datele referitoare la prognosticul pacientului. Rolul acestor factori de risc ar consta în identificarea rapidă a pacienților care ar putea beneficia de CR timpurie, înainte ca aceștia să ajungă în stadiile avansate, cu ganglioni loco-regionali pozitivi sau în stadii metastatice. Suplimentar, acești factori de risc ar putea identifica pacienții cu prognostic nefavorabil, care ar avea o supraviețuire prelungită și o calitate mai bună a vieții dacă ar fi tratați prin variantele alternative de tratament ale CUV, respectiv combinații între TUR-V, cistectomie parțială, chimioterapie și radioterapie.

Cyfra 21-1 este un fragment al citokeratinei 19 cu rol în formarea filamentelor citoscheletului. Cyfra 21-1 este o proteină solubilă caracteristică epitelilor și poate fi întâlnită în ser, urină sau în alte tipuri de fluide, atunci când apare liza celulară. Două tipuri de anticorpi monoclonali, BM 19-21 sau KS 19-1, pot fi folosiți în detectarea Cyfra 21-1, utilizând metodele ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sau ECLIA (electrochemiluminescence immunoassay). Cyfra 21-1 a fost studiat ca marker tumoral eficient în neoplasmul pulmonar și oro-faringian, dar a fost util și în decelarea stadiilor avansate ale cancerului de sân, gastric sau colo-rectal. În ceea ce privește CUV, Cyfra 21-1 poate fi dozat atât în ser, cât și în urină. Niveluri scăzute de Cyfra 21-1 pot fi decelate la subiecți sănătoși, cu uroteliu fără modificări, însă nivelurile cresc exponențial odată cu creșterea ratei de liză celulară din CUV.

Cyfra 21-1 a fost studiat ca marker de diagnostic în CUV, însă datele din literatură nu sunt consistente. O meta-analiză, publicată în 2015, a concluzionat că Cyfra 21-1 seric are o sensibilitate scăzută, de numai 42%, și o specificitate de 94% în detecția CUV, în timp ce Cyfra 21-1 urinară are o sensibilitate de 82% și o specificitate de 80% [1]. Valori crescute ale Cyfra 21-1 urinare pot fi întâlnite la pacienți cu litiază de aparat urinar, infecții urinare sau cu istoric de tratament instilațional cu BCG [2]. Rezultatele acestei cercetări trebuie interpretate în contextul în care o parte dintre studiile incluse în această meta-analiză a avut ca pacienți cuprinși în grupul de control și bolnavi diagnosticați cu patologii ce oferă rezultate fals pozitive ale Cyfra 21-1 urinare.

Cyfra 21-1 urinară poate avea o sensibilitate mai crescută decât citologia urinară în diagnosticarea CUV. Un studiu a observat rate mai mari de detecție a CUV în favoarea Cyfra 21-1 urinare pentru fiecare grad de diferențiere și fiecare stadiu T. Cyfra 21-1 urinară a diagnosticat 71% dintre pacienții cu tumori primare și 65% dintre pacienții cu recidivă care au

avut citologie urinară negativă [2]. Un alt studiu publicat în 2007 susține utilitatea scăzută a Cyfra 21-1 urinară în detecția recidivelor tumorale NMI după TUR-V [3]. Totuși, prin comparație cu Cyfra 21-1 măsurată în ser, citologia urinară se dovedește superioară în detecția CUV pentru fiecare stadiu T și fiecare grad de diferențiere tumorală [4].

Nivelurile crescute ale Cyfra 21-1 serice au fost măsurate în stadiile avansate și gradele crescute de diferențiere tumorală. Un studiu a observat că Cyfra 21-1 serică ar putea fi un factor de prognostic pentru pacienții cu CUV. Studiul a avut, însă, limitări importante ca numărul mare de pacienți tratați prin TUR-V și numărul scăzut de pacienți tratați prin CR, măsurarea nivelurilor Cyfra 21-1 serice după efectuarea intervențiilor chirurgicale la unii pacienți și includerea unor pacienți care au avut istoric de chimioterapie și radioterapie pentru CUV [5]. Un alt studiu a observat că nivelul seric al Cyfra 21-1 este corelat cu răspunsul la chimioterapia adjuvantă, scăzând pentru pacienții care răspund la tratament și crescând la cei care au progresia imagistică a bolii [6]. Deși rezultatele din literatură sunt contradictorii, capacitatea Cyfra 21-1 de a fi un marker de diagnostic pentru CUV este foarte scăzută. O meta-analiză publicată în 2015 a concluzionat că Cyfra 21-1 urinară și serică pot doar să diferențieze stadiile localizate ale bolii de cele metastatice [7].

Datele din literatura de specialitate susțin că, deși majoritatea secvențelor de ADN uman sunt activ transcrise, doar aproximativ 3% dintre acestea codifică o proteină. ARN-urile necodificatoare (ncARN) reprezintă cea mai mare parte a acestor transcrieri, iar micro-ARN-urile sunt o categorie aparte a ARN-urilor necodificatoare. Micro-ARN-urile sunt molecule ce conțin 18-25 nucleotide și au un rol important în modularea expresiei genelor implicate în procese celulare ca proliferare, apoptoză, invazie și migrație. Ele se atașează la capătul 3' al ARN-ului mesager (mARN) pe care acestea îl vizează, capăt 3' la care nu are loc fenomenul de translație. Odată cu atașarea micro-ARN-ului la mARN, are loc un proces de degradare ce duce, în final, la suprimarea genei ce a fost inițial semnalizată de către mARN [8].

Profilul de micro-ARN-uri este variat în diferite tipuri de tumori maligne și poate fi diferit și între pacienții cu același tip de neoplasm. Profilul micro-ARN influențează semnificativ expresia genelor asociate cancerului prin activarea factorului de transcripție, deleții cromozomiale, amplificări cromozomiale sau metilarea promotorului. Expresia diferitelor specii de micro-ARN poate duce astfel la creșterea sau scăderea diferențierii celulare, accelerarea sau încetinirea ciclului celular, creșterea supraviețuirii celulelor sau accelerarea

procesului de apoptoză celulară, creșterea invazivității și a metastazării sau încetinirea acestora. Prin urmare, putem deosebi specii de micro-ARN ce joacă un rol oncogenic și specii de micro-ARN cu funcție supresoare tumorală, în funcție de țintele mRNA-urilor pe care micro-ARN-urile le controlează. Totuși, în funcție de țintele și de mecanismele de acțiune, aceeași specie de micro-ARN poate juca un rol oncogenic într-un anumit tip tumoral și un rol supresor într-un alt tip tumoral. Totodată, ele pot influența mai multe gene ce fac parte din aceeași cale de semnalizare sau din căi de semnalizare diferite, având, astfel, efect la mai multe niveluri biomoleculare în cadrul aceleiași boli.

Identificarea profilelor micro-ARN în neoplasmale umane și elucidarea mecanismelor moleculare pe care speciile de micro-ARN le mediază, reprezintă un pas important către identificarea unor noi biomarkeri și personalizarea tratamentului fiecărui pacient diagnosticat cu cancer. Micro-ARN-ul poate fi considerat o metodă de tratament, FDA aprobând recent folosirea primelor două tratamente ce modulează expresiile ARN, lucru care a dus la creșterea numărului de trialuri clinice în care sunt incluse medicamente ce acționează asupra expresiei ARN. Dezavantajele acestor tipuri de medicamente sunt legate de specificitatea scăzută față de țesutul vizat, de riscul de toxicitate sistemică în condițiile unei absorbții celulare deficitare, dar și de administrarea suboptimală. Patisiran a fost primul medicament aprobat în anul 2018 pentru tratamentul polineuropatiei din cadrul amiloidozei ereditare mediate de transtiretină, în timp ce Givosiran a fost aprobat în 2020 ca tratament al porfiriei hepatice acute.

Evaluarea expresiei micro-ARN a fost efectuată atât în țesuturi tumorale sau non-tumorale, cât și în fluide biologice – saliva, plasma, urina etc., această expresie fiind diferită la pacienții neoplazici prin comparație cu subiecții sănătoși, sau între diferite tipuri de țesut sau de fluid analizat. La pacienții diagnosticați cu CUV, identificarea micro-ARN-urilor se poate face atât la nivel tisular, cât și la nivel urinar. Multiple articole publicate au analizat diferențele de expresie ale micro-ARN-urilor între țesuturile tumorale și țesuturile non-tumorale, găsind diferențe semnificative între cele două tipuri de țesuturi. Cu toate acestea, mecanismele complete de acțiune și funcțiile micro-ARN-urilor sunt departe de a fi elucidate.

Micro-ARN-urile urinare au fost subiect de studiu în mai multe articole care au avut ca scop evaluarea capacității diagnostice a speciilor de micro-ARN. În pofida rezultatelor promițătoare, niciun autor nu a reușit să identifice un panel de specii micro-ARN care să poată substitui cistoscopia, ca metodă de diagnostic al CUV [9]. Un articol publicat în 2017, care a

folosit un profil format din 4 specii de micro-ARN, a concluzionat că nivelul crescut de metilare în urină a micro-ARN-urilor este un predictor pentru apariția recidivei și pentru progresia bolii [10].

Studiul efectuat în cadrul acestei teze își propune identificarea biomarkerilor clinico-biologici cu rol prognostic, care pot prezice evoluția postoperatorie a pacienților și supraviețuirea acestora după CR. Markerii analizați în cadrul tezei de doctorat sunt reprezentați de valorile hemoglobinei și ale creatininei serice preoperatorii, numărul de unități de masă eritrocitară transfuzate, valorile postoperatorii ale hemoglobinei și creatininei serice, valorile serice ale Cyfra 21-1 măsurate preoperator și postoperatoriu la 3, 6, 12 și 18 luni de la CR, profilul micro-ARN tumoral al pacientului, format din miR-124, miR-126, miR-139, miR-145-3p, miR-145-5p, miR-152 și miR-182. Studiul profilului micro-ARN are rolul de a identifica speciile de micro-ARN care se corelează cu supraviețuirea pacienților sau cu restul parametrilor analizați. Analiza datelor clinico-biologice și a markerilor propuși va duce la stabilirea factorilor predictivi pentru supraviețuire în vederea clasificării pacienților în grupe de risc și identificarea aceluia care vor avea beneficii în urma CR în ceea ce privește supraviețuirea.

Obiectivele specifice ale acestei cercetări sunt reprezentate de decrierea lotului de pacienți incluși în studiu, identificarea factorilor clinico-biologici predictivi pentru evoluția postoperatorie nefavorabilă și analiza markerilor propuși asociați cu supraviețuirea postoperatorie scăzută.

METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

În acest studiu prospectiv, longitudinal, observațional au fost incluși, consecutiv, 91 pacienți diagnosticați cu CUV și cu indicație chirurgicală de CR, stabilită în urma efectuării investigațiilor clinice și paraclinice. Acești pacienți au fost tratați prin CR de către chirurghi experimentați din Centrul de Urologie și Transplant Renal din cadrul Institutului Clinic Fundeni, în perioada martie 2017 – decembrie 2018 și au fost urmăriți postoperatoriu până la data de 1 Mai 2020. Criteriile de includere pentru pacienții din lotul analizat au fost diagnosticul de tumoră vezicală, rezultatul histo-patologic de carcinom urotelial obținut în urma rezecției endoscopice, indicația de CR stabilită în urma rezultatului histopatologic sau în urma progresiei imagistice a bolii. Am exclus din studiu pacienții care au fost tratați prin chimioterapie

neoadjuvantă din cauza faptului că aceștia ar fi putut avea valorile modificate ale biomarkerilor selectați, consecutiv tratamentului preoperator. Totodată, au fost excluși și pacienții diagnosticați cu un alt tip de neoplazie în ultimii 10 ani sau care aveau suspiciunea unui alt tip de cancer la momentul CR. Înrolarea pacienților în lotul studiat a presupus acordul informat al acestora pentru participarea la un proiect de cercetare. Formularul de consimțământ a fost special elaborat pentru a permite recoltarea, manipularea și analizarea probelor tisulare din punct de vedere genetic. Consiliul de Etică din cadrul Institutului Clinic Fundeni a avizat efectuarea acestei cercetări, studiind protocolul de lucru și tipul de formular de consimțământ folosite.

Evaluarea preoperatorie a pacienților a inclus stadializarea imagistică prin efectuarea unei investigații de înaltă performanță, TC sau IRM cu substanță de contrast, cu scopul de a aprecia atât invazia locală a tumorii și prezența adenopatiilor loco-regionale și extra-regionale, cu rol de metastaze, cât și prezența determinărilor secundare viscerale. Anamneza a fost utilă pentru evaluarea statusului pacienților și decelarea comorbidităților acestora, dar și pentru aprecierea factorilor de risc responsabili de apariția CUV la care au fost expuși bolnavii. Astfel, comorbiditățile pacienților au fost apreciate conform Charlson Comorbidity Index (CCI), iar factorii de risc identificați au fost genetici, ocupaționali, istoricul personal de infecții de tract urinar (ITU) repetate și, nu în ultimul rând, fumatul. Din istoricul pacienților cu rezecții endoscopice pentru tumori vezicale am reținut rezultatele histo-patologice ale intervențiilor chirurgicale, dar și substanța care s-a folosit în tratamentul intravezical, în cazul pacienților care au avut tratament instilațional. Parametrii paraclinici preoperatori urmăriți în cadrul studiului au fost hemoglobina și creatinina serică, împreună cu valoarea serică a Cyfra 21-1.

În ceea ce privește intervenția chirurgicală, principalii parametri urmăriți au fost cei descriși în buletinul histo-patologic – invazia locală a tumorii (pT), prezența adenopatiilor (pN) în cazul în care s-a practicat limfodisecție loco-regională, prezența invaziei limfo-vasculare (LVI), prezența invaziei peri-neurale (PNI), gradul de diferențiere al tumorii LG/HG (low-grade/high-grade) și tipul histologic particular al carcinomului urotelial, dacă a fost cazul. În plus, am notat și tipul derivației urinare efectuate, în vederea corelării cu evoluția postoperatorie și cu supraviețuirea pacienților.

Parametrii postoperatori analizați în cadrul studiului au fost hemoglobina și creatinina serică la externarea pacientului din spital și numărul total de unități de masă eritrocitară care s-

au transfuzat pacientului. Urmărirea pacienților după externare a presupus monitorizarea valorilor Cyfra 21-1 serice la 3, 6, 12 și 18 luni de la CR și monitorizarea periodică imagistică prin investigații de înaltă performanță în vederea stabilirii bilanțului oncologic al pacienților. Perioada de urmărire a pacienților s-a întins de la data intervenției chirurgicale și până la data de 1 mai 2020. Supraviețuirea pacienților a fost determinată lunar, pentru fiecare în parte, clasificând bolnavii în 3 categorii distincte în funcție de statusul acestora la sfârșitul perioadei de urmărire, astfel: pacienți în viață la data de 1 mai 2020, pacienți care au decedat prin cauze oncologice în timpul perioadei de urmărire și pacienți cu deces prin alte cauze în timpul monitorizării. De asemenea, pentru fiecare pacient decedat, a fost notat numărul de luni de supraviețuire de la momentul CR.

Evaluarea profilului micro-ARN a presupus determinarea expresiei speciilor micro-ARN propuse pentru studiu - miR-124, mir-126, miR-139, miR-145-3p, miR-145-5p, miR-152 și miR-182. Recoltarea probelor tisulare în vederea analizei profilului micro-ARN propus s-a efectuat imediat după excizia piesei de cistectomie. Astfel, după inspecția și secționarea piesei de cistectomie, au fost prelevate probe tisulare din formațiunea tumorală și de la nivelul unui perete vezical neinvadat tumoral, normal din punct de vedere macroscopic. Procesul complex de determinare a expresiei speciilor micro-ARN a fost finalizat prin notarea numărului de cicluri (CT = Cycle Threshold) necesar pentru ca reacția RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) să fie pozitivă prin apariția semnalului fluorescent.

Determinarea expresiilor micro-ARN obținute în urma efectuării RT-PCR a fost făcută atât direct, de la nivelul țesutului tumoral și normal, cât și prin normalizarea nivelului de expresie. Această etapă implică compararea variațiilor biologice reale, care să explice fenotipul analizat, cu expresiile induse experimental. Astfel, pentru determinarea expresiilor micro-ARN se folosește comparația cu un ARN de referință, numit control endogen. Am folosit ca ARN de referință în cadrul studiului RNU48 (small nucleolar RNA C/D box 48, SNORD48 small nucleolar RNA), un ARN nuclear de mici dimensiuni, necodificator, folosit cu succes drept control endogen în multiple tipuri de patologii din sfera urologică.

Pentru a măsura nivelul expresiei normalizate am folosit metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ sau Livak [11], care este una dintre metodele standardizate, cele mai des folosite în determinarea expresiei micro-ARN-urilor. Pentru fiecare specie micro-ARN am notat cu $\Delta CT_{\text{tumoral}}$ diferența între CT tumoral și controlul endogen (RNU48). $\Delta CT_{\text{normal}}$ reprezintă media pentru toți cei 91 pacienți a

diferenței dintre CT normal și RNU48, pentru fiecare specie de micro-ARN. În final, am notat cu $\Delta\Delta CT$ diferența dintre $\Delta CT_{\text{tumoral}}$ și $\Delta CT_{\text{normal}}$ și cu FC (Fold Change), valoarea ajustată a expresiei micro-ARN, calculată conform formulei $2^{-\Delta\Delta CT}$. Folosind această metodă, expresia profilului micro-ARN studiat la nivel tumoral va fi normalizat față de controlul endogen și analizat prin comparație cu expresia de la nivelul uroteliului normal. Astfel, valori ale FC cuprinse între 0 și 1 vor arăta că expresia micro-ARN-ului studiat este redusă, în timp ce valorile de peste 1 vor demonstra că expresia micro-ARN-ului studiat este crescută.

Analiza statistică a căutat să identifice parametrii clinico-demografici care influențează supraviețuirea globală (Overall Survival = OS), metodologia fiind următoarea: în cazul în care parametrii au fost variabile de categorie, analiza a fost de tip Kaplan-Meier, curbele de supraviețuire corespunzătoare categoriilor parametrului fiind comparate cu ajutorul unui test log-rank, în vreme ce pentru parametrii continui a fost folosită o regresie Cox simplă, iar dacă rezultatul regresiei a identificat o influență semnificativă statistic, s-a făcut o analiza ROC pentru a determina o valoare de cut-off pentru parametru, după care s-a procedat ca în cazul parametrilor categoricali (valoarea de cut-off determinând categoriile).

Analiza ANOVA, testul Mann-Whitney și testul t Student au fost folosite în studiul variației variabilelor continue în funcție de statusul pacienților la sfârșitul perioadei de urmărire postoperatorie. Variabilele categorice au fost evaluate prin testul χ^2 . Am folosit regresia Cox univariată pentru a evalua capacitatea unui parametru de a reprezenta un factor de risc pentru deces, dar și regresia Cox multivariată pentru a evalua dacă parametrii analizați sunt factori de risc independenți pentru deces. Testul Spearman Rho a fost utilizat pentru a identifica corelațiile între parametrii histo-patologici și valorile preoperatorii ale Cyfra 21-1, dar și între expresiile ajustate ale speciilor micro-ARN și parametrii predictivi identificați în cercetare. În final, am folosit modelul Nelson-Aalen pentru a determina evoluția în timp a funcțiilor de hazard pentru predictorii identificați. Am considerat ca fiind semnificative din punct de vedere statistic, testele care au returnat o valoare $p < 0.05$. Totuși, am considerat că și valorile marginale ale p (cuprinse între 0.05 și 0.10) pot avea o semnificație relativă în ceea ce privește corelația parametrilor clinico-biologici și histo-patologici cu expresiile ajustate ale speciilor de micro-ARN studiate, în condițiile în care literatura de specialitate nu oferă suficiente date cu privire la acestea.

Pentru analiza statistică s-au folosit programul RTM (The R Foundation for Statistical Computing, R Core Team, Vienna, Austria) și programul StataTM 13/MP (StataCorp LLC, College Station, Texas, Statele Unite ale Americii).

STUDIUL NR 1 – ANALIZA FACTORILOR CLINICI ȘI BIOLOGICI CE INFLUENȚEAZĂ SUPRAVIEȚUIREA PACIENȚILOR CU CARCINOM UROTELIAL VEZICAL, TRATAȚI PRIN CISTECTOMIE RADICALĂ

CUV este al doilea cel mai frecvent tip de cancer pe care îl tratează chirurgii urologi, imediat după cancerul de prostată. O proporție destul de ridicată dintre pacienții diagnosticați cu CUV ajunge să fie tratată prin CR. Totuși, ratele de supraviețuire la 5 ani postoperatoriu sunt relativ mici, în timp ce ratele de complicații postoperatorii, ratele de recidivă locală și de metastazare sunt relativ crescute [12–14]. Literatura de specialitate oferă date contradictorii despre mulți dintre parametri analizați în acest studiu. Pentru a înțelege mai bine comportamentul bolii și pentru a consilia preoperator pacienții în mod adecvat, am analizat, în acest studiu, mai mulți parametri clinici și biologici, preoperatori și postoperatori, cu scopul de a evidenția capacitatea lor predictivă și influența asupra supraviețuirii globale (OS).

Rezultate

Analiza descriptivă și datele demografice ale pacienților sunt prezentate în *Tabelul 1*. Datele sunt prezentate ca medie \pm deviație standard (D.S) pentru variabilele continue și ca frecvențe absolute (frecvențe relative) pentru variabilele categoricale. Astfel, lotul studiat a inclus 91 pacienți cu o vârstă medie de 64.75 ± 9.88 ani și un raport pe sexe femei:bărbați de 1:4.35. Pacienții incluși în studiu au avut o anamneză minuțioasă care a dus la identificarea mai multor clase de factori de risc, responsabili de apariția CUV, la care aceștia s-au expus. La mai mulți pacienți au fost identificați, simultan, doi sau trei factori de risc, motiv pentru care suma procentelor depășește 100%. Fumatul și ITU repetate în antecedente au fost cele mai frecvente cauze de apariție a CUV ce au putut fi identificate în populația studiată, la 67.03% și, respectiv, la 57.14% dintre pacienți. Istoricul de TUR-V la internare a fost întâlnit la 70% dintre pacienții tratați prin CR. Un procent de 36.2% pacienți au avut rezultat histo-patologic cu boala musculo-

invazivă pe piesa de rezeție endoscopică, în timp ce 34.1% au avut progresia CUV-NMI rezecat endoscopic. Restul pacienților incluși în studiu au avut prima prezentare în cadrul Centrului de Uronefrologie și Transplant Renal Fundeni în care au fost diagnosticați imagistic cu CUV-MI și rezultat histo-patologic la biopsie de carcinom urotelial. 14 pacienți (15.4%) din lot au avut istoric de tratament instilațional.

Tabel 1 – Caracteristicile preoperatorii ale pacienților incluși în cercetare

Variabila	Total (N=91)
Vârsta – Medie ± D.S	64.8 ± 9.9
Sex	
M – Nr (%)	74/91 (81.3%)
F – Nr (%)	17/91 (18.7%)
Factori de risc*	
Fumat – Nr (%)	61/91 (67.0%)
ITU – Nr (%)	52/91 (57.1%)
Genetici – Nr (%)	7/91 (7.7%)
Ocupaționali – Nr (%)	6/91 (6.6%)
Istoric de TUR-V la internare – Nr (%)	64/91 (70.3%)
Cu rezultat HP de CUV-MI – Nr (%)	33/91 (36.2%)
Cu rezultat HP de CUV-NMI și progresia bolii – Nr (%)	31/91 (34.1%)
Tratament instilațional în antecedente – Nr (%)	14/91 (15.4%)
Epirubicin – Nr (%)	7/91 (7.7%)
BCG – Nr (%)	5/91 (5.5%)
Farmarubicin – Nr (%)	2/91 (2.2%)
Stadializare preoperatorie (imagistică)	
cT2 – Nr (%)	18/91 (19.8%)
cT3 – Nr (%)	40/91 (44.0%)
cT4 – Nr (%)	33/91 (36.2%)
Stadializare preoperatorie (imagistică)	
cN0 – Nr (%)	29/91 (31.9%)
cN1 – Nr (%)	19/91 (20.9%)
cN2 – Nr (%)	21/91 (23.1%)
cN3 – Nr (%)	22/91 (24.1%)
Stadializare preoperatorie (imagistică)	
M1 – Nr (%)	13/91 (14.3%)
Metastaze pulmonare – Nr (%)	8/91 (8.8%)

Metastaze limfo-ganglionare – Nr (%)	2/91 (2.2%)
Metastaze osoase – Nr (%)	2/91 (2.2%)
Metastaze hepatice – Nr (%)	1/91 (1.1%)
Indicele de comorbiditate Charlson (CCI) 0 – Nr (%)	38/91 (41.7%)
1 – Nr (%)	29/91 (31.9%)
2 – Nr (%)	13/91 (14.3%)
≥3 – Nr (%)	11/91 (12.1%)

**Au fost pacienți cu mai mulți factori de risc prezenți, suma procentelor este peste 100*

Stadializarea imagistică realizată preoperator a evidențiat că un important procent dintre pacienți se află în stadii avansate ale bolii, conform datelor din *Tabelul 1*. Rezultatul imagistic a clasificat pacientul într-un stadiu local avansat al bolii (cel puțin cT3) în 80.2% din cazuri, în timp ce 68.1% dintre pacienți aveau descrise adenopatii loco-regionale în rezultatul investigației imagistice. Concomitent, 14.3% dintre pacienți prezentau deja metastaze în momentul CR. Comorbiditățile pacienților au fost evaluate prin CCI, scorul pacienților având o medie de 0.97 ± 1.02 . Astfel, doar 26.4% dintre pacienți au avut un scor CCI de cel puțin 2 puncte.

Rezultatele buletinelor histo-patologice ale pacienților tratați prin CR sunt descrise în *Tabelul 2*. 11% dintre pacienți au avut CUV-NMI pe piesa de CR, în timp ce 61.5% au fost surprinși în stadiile pT3 și pT4. În cazul a 20 pacienți (22.0%) nu s-a practicat limfodisectie loco-regională din cauza comorbidităților asociate și a riscurilor crescute de complicații intraoperatorii și postoperatorii, sau din cauză că CR a avut un rol hemostatic și de creștere a calității vieții pacientului. Mai mult de 90% dintre pacienți au avut pe piesa de CR, CUV cu grad înalt de malignitate, în timp ce LVI și PNI au fost prezente pe buletinul histo-patologic al unui procent de 61.5% și, respectiv, 42.9% dintre pacienți. Majoritatea pacienților a avut ca tip tumoral, CUV convențional, însă au fost și pacienți care au avut tipuri diferite de diferențiere ale CUV. 17.6% dintre pacienți au avut CUV cu diferențiere scuamoasă, 13.2% au avut CUV micropapilar, în timp ce CUV cu arii de comedocarcinom și diferențierea sincițiotrofoblastică a fost întâlnită în 6.6% și, respectiv, 5.5% dintre pacienți. În lotul studiat, am avut și pacienți cu tipuri de diferențiere a CUV întâlnite rar, precum tipul cu celule în cuiburi „nested” (2.2%), sarcomatoidă (1.1%), plasmocitoidă (1.1%).

La 12 dintre pacienți (13.2%) a fost descoperit, incidental, pe piesa de CR, un focar de adenocarcinom prostatic. 9 dintre pacienți au avut neoplasm prostatic acinar scor Gleason 6

(3+3), doi pacienți au avut neoplasm prostatic acinar scor Gleason 7 (3+4), iar un pacient a avut un rezultat histo-patologic care a inclus focar de carcinom prostatic acinar scor Gleason 7 (4+3). Toți acești pacienți au avut valori preoperatorii normale ale PSA-ului seric și tușeu rectal efectuat în cadrul examenului clinic la internare care nu ridică suspiciunea de neoplasm prostatic. Niciunul dintre pacienți nu a avut ganglioni pozitivi pentru adenocarcinom prostatic la limfodisecția ilio-obturatorie. Monitorizarea postoperatorie a acestor pacienți a inclus și monitorizarea valorilor PSA-ului seric. Niciunul dintre pacienți nu a avut o creștere semnificativă a PSA-ului față de valoarea nadir care să ridice suspiciunea de recidivă a neoplasmului prostatic.

Tabel 2 – Caracteristicile histo-patologice ale pacienților tratați prin CR

Variabila		Total (N=91)
Stadiul pT	NMI – Nr (%)	10/91 (11.0%)
	pT2 – Nr (%)	25/91 (27.5%)
	pT2a – Nr (%)	14/91 (15.4%)
	pT2b – Nr (%)	11/91 (12.1%)
	pT3 – Nr (%)	33/91 (36.2%)
	pT3a – Nr (%)	5/91 (5.5%)
	pT3b – Nr (%)	28/91 (30.7%)
	pT4 – Nr (%)	23/91 (25.3%)
	pT4a – Nr (%)	22/91 (24.2%)
	pT4b – Nr (%)	1/91 (1.1%)
	Stadiul pN	pNx – Nr (%)
pN0 – Nr (%)		48/91 (52.7%)
pN1 – Nr (%)		9/91 (9.9%)
pN2 – Nr (%)		10/91 (11.0%)
pN3 – Nr (%)		4/91 (4.4%)
Grad de diferențiere	Grad scăzut de malignitate (LG) – Nr (%)	8/91 (8.8%)
	Grad înalt de malignitate (HG) – Nr (%)	83/91 (91.2%)
Tip de diferențiere histo-patologică	Micropapilar – Nr (%)	12/91 (13.2%)
	Sincitiotrofoblastic – Nr (%)	5/91 (5.5%)

	Scuamos – Nr (%)	16/91 (17.6%)
	Celule în Cuiburi „Nested” – Nr (%)	2/91 (2.2%)
	Comedocarcinom – Nr (%)	6/91 (6.6%)
	Sarcomatoid – Nr (%)	1/91 (1.1%)
	Plasmocitoid – Nr (%)	1/91 (1.1%)
	Nediferentiat – Nr (%)	1/91 (1.1%)
Invazie limfovasculara (LVI)	Da – Nr (%)	56/91 (61.5%)
	Nu – Nr (%)	35/91 (38.5%)
Invazie perineurala (PNI)	Da – Nr (%)	39/91 (42.9%)
	Nu – Nr (%)	52/91 (57.1%)
Focar adenocarcinom prostatic	Gleason 6 (3+3)	9/91 (9.9%)
	Gleason 7 (3+4)	2/91 (2.2%)
	Gleason 7 (4+3)	1/91 (1.1%)

Parametrii biochimici analizați în studiu au fost Cyfra 21-1 serică, hemoglobina și creatinina serică, valorile medii ale acestora fiind reprezentate în *Tabelul 3*, împreună cu numărul unităților de masă eritocitară transfuzate pacienților cu CR.

Tabel 3 - Analiza descriptivă a probelor biochimice și numărul unităților MER transfuzate pentru pacienții incluși în studiu

Variabila	Medie ± D.S
Cyfra 21-1 Preoperator	7.55 ± 16.71
Cyfra 21-1 la 3 luni Postoperatoriu	4.97 ± 12.61
Cyfra 21-1 la 6 luni Postoperatoriu	6.39 ± 13.91
Cyfra 21-1 la 12 luni Postoperatoriu	9.39 ± 21.22
Cyfra 21-1 la 18 luni Postoperatoriu	10.9 ± 26.30
Hemoglobina la Internare	12.99 ± 2.02
Hemoglobina la Externare	10.71 ± 1.47
Unități MER transfuzate	1.3 ± 0.9
Creatinina serică la Internare	1.48 ± 1.33
Creatinina serică la Externare	1.32 ± 1.40

Urmărirea pacienților a fost făcută până la 1 Mai 2020, iar OS este reprezentată în *Figura 1*. Niciunul dintre pacienții incluși în lot nu a fost pierdut din urmărirea postoperatorie a supraviețuirii. Cenzorii din curba Kaplan-Meier sunt reprezentați de cei 54 pacienți aflați în viață la sfârșitul perioadei de follow-up, timpul minim de urmărire pentru acești pacienți fiind de 17 luni, iar cel maxim, 38 luni. În această perioadă, 40.7% dintre pacienți au decedat, dintre care 28 au avut o mortalitate prin cancer, cu progresia imagistică a bolii în perioada de urmărire, iar 9 dintre pacienți au decedat prin alte cauze (infarct miocardic acut, accident vascular cerebral sau traumatism prin accident rutier).

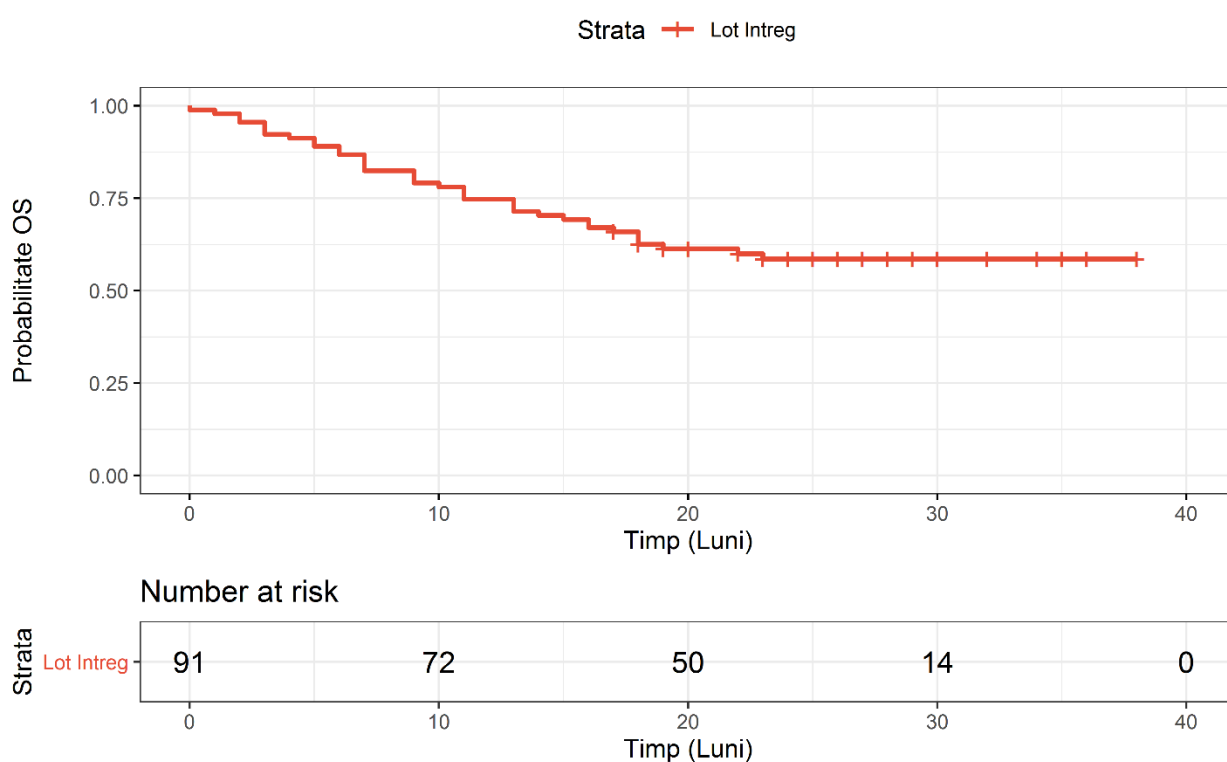


Figura 1 - Analiza OS pe întreg lotul de pacienți

Vârsta nu a influențat OS a pacienților din lotul analizat. Singura semnificație statistică am obținut-o doar atunci când am comparat vârsta pacienților decedați prin cauze oncologice cu cea a pacienților decedați prin alte cauze. Astfel, am observat că decesele din cauze oncologice au survenit la pacienți mai tineri prin comparație cu decesele din alte cauze, care s-au înregistrat în randul pacienților vârstnici ($p = 0.0284$).

Analiza Kaplan-Meier și testul log-rank au arătat că bărbații incluși în lot au avut o mortalitate mai mare (47.3% vs 11.8%) și o medie restrictivă de supraviețuire mai mică (17.80

luni vs 32.30 luni), față de pacienții de sex feminin ($p = 0.01$). Scorul CCI și istoricul de tratament instilațional nu au influențat supraviețuirea pacienților ($p = 0.09$, respectiv $p = 0.40$).

Dintre factorii de risc identificați pentru apariția CUV, analiza statistică a arătat că doar cei ocupaționali au influențat OS a pacienților ($p = 0.04$), conform *Figurii 2*.

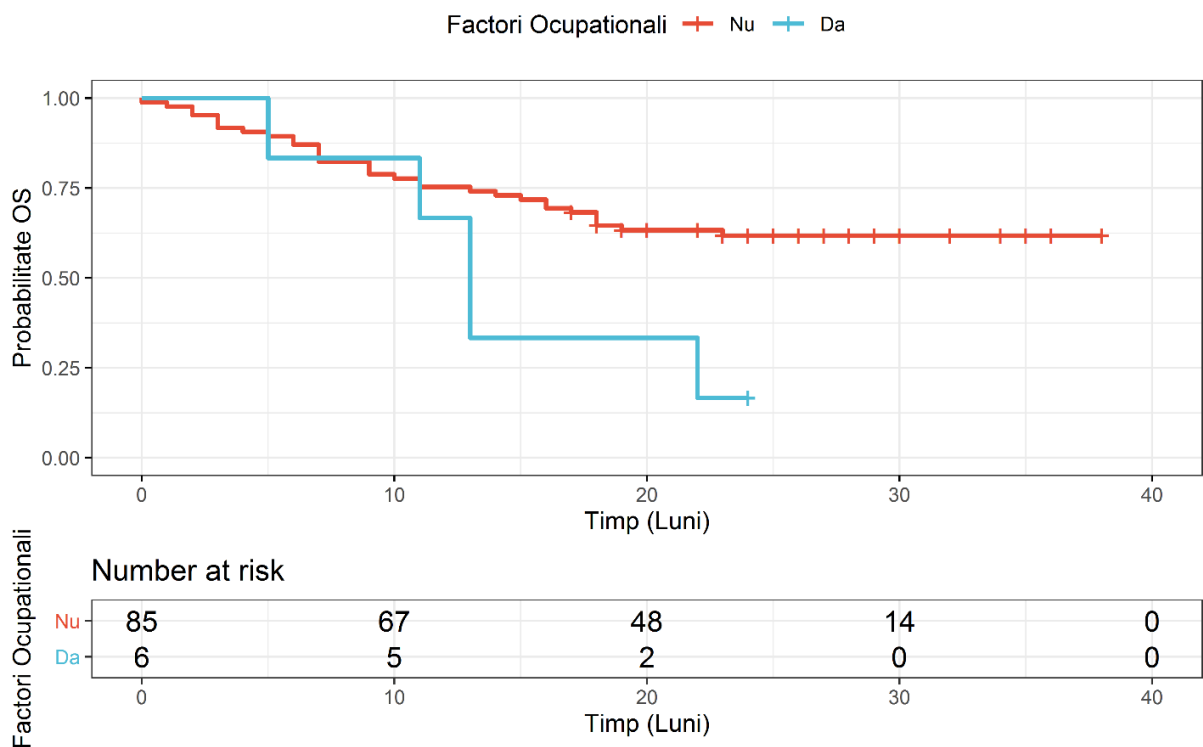


Figura 2 – Analiza Kaplan-Meier a influenței expunerii la factori de risc ocupaționali asupra supraviețuirii

Stadializarea imagistică preoperatorie, efectuată prin investigații de înaltă performanță (TC sau IRM), a clasificat pacienții în categorii diferite ale stadiului cT și cN, iar analiza Kaplan-Meier și testul log-rank au arătat că există diferențe semnificative în ceea ce privește supraviețuirea pacienților ($p = 0.04$, respectiv $p = 0.04$). De asemenea, stadiul metastatic preoperator a influențat în mod negativ supraviețuirea pacienților ($p < 0.001$), supraviețuirea pacienților fiind reprezentată în *Figura 3*.

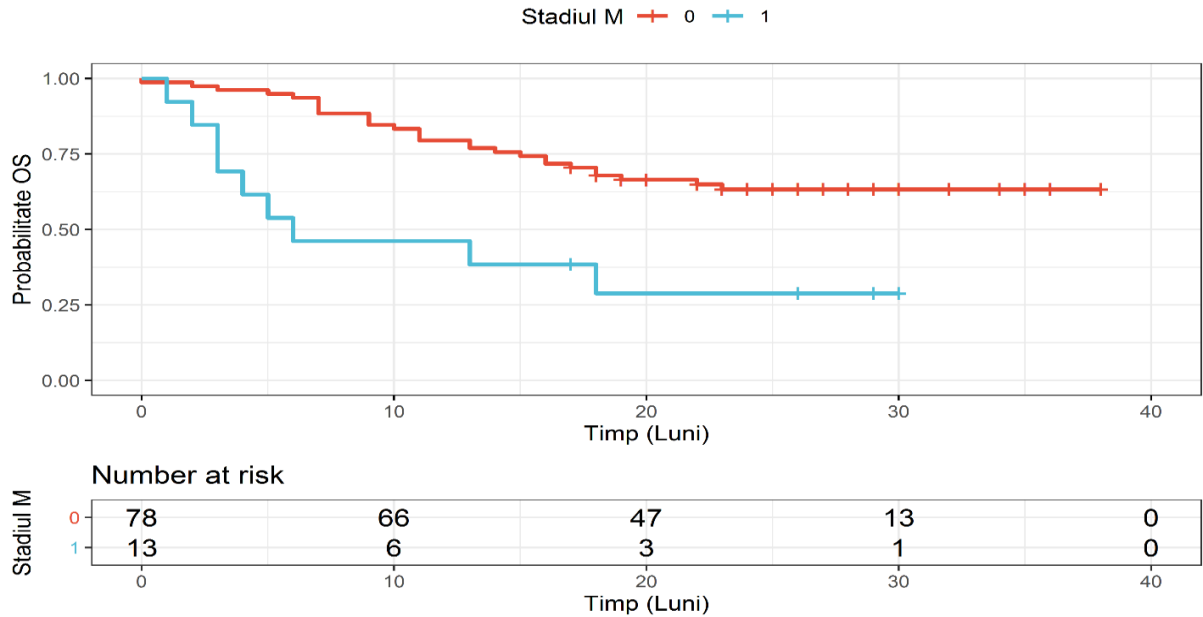


Figura 3 – Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier ale pacienților metastatici și non-metastatici la momentul cistectomiei radicale

Analiza Kaplan-Meier a stadiului patologic pT și pN a arătat că există diferențe semnificative în ceea ce privește supraviețuirea pacienților ($p < 0.001$, respectiv $p = 0.0037$). Gradul de diferențiere tumorală nu a influențat OS a pacienților ($p = 0.30$), în timp ce prezența diferențierii sincitiotrofoblastice a dus la scăderea semnificativă a ratelor OS la pacienții incluși în studiu ($p < 0.0001$), conform curbelor Kaplan-Meier și testului log-rank (Figura 4).

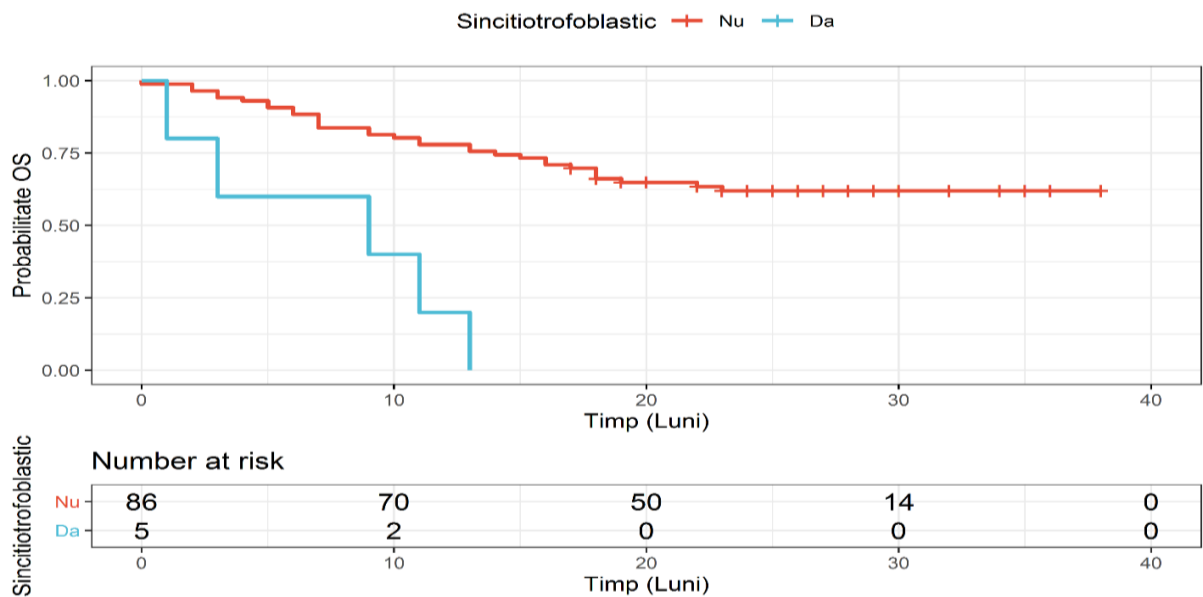


Figura 4 – Curbele Kaplan-Meier în funcție de prezența diferențierii sincitiotrofoblastice

Astfel, media restrictivă a supraviețuirii pacienților cu CUV cu diferențiere sincițiotrofoblastică a fost de 7.4 luni. Toți pacienții din acest grup au decedat în cursul urmăririi postoperatorii, în timp ce supraviețuirea maximă a acestor pacienți a fost de 13 luni postoperatoriu.

Nu au existat diferențe semnificative ale OS pentru pacienții cu LVI, prin comparație cu pacienții care nu au avut LVI ($p = 0.20$) și pentru pacienții cu PNI, prin comparație cu pacienții care nu au avut PNI ($p = 0.09$).

În ceea ce privește derivația urinară efectuată la pacienții cu CR, ureterostomia cutanată a fost folosită în 71.4% dintre cazuri, 18 pacienți au avut derivație urinară tip Briker și 6 pacienți au avut derivație ortotopică tip Camey 2 modificat. La doi dintre pacienții incluși în studiu, aflați în program de hemodializă cronică, nu a fost nevoie de timp de efectuare a derivației urinare. Unul dintre pacienți a fost anefric, iar la celălalt s-a ligaturat ureterul restant, fiind cu rinichi unic nefuncțional. Testul χ^2 a returnat p marginal ne semnificativ ($p = 0.078$), analizând statusul pacienților la sfârșitul perioadei de urmărire în funcție de derivația urinară.

Relația dintre valoarea **Hemoglobinei (Hb)** la internare și (OS), a fost studiată folosind o regresie Cox simplă ce a arătat o puternică corelație între acestea ($p=0.0005$, coeficient -0.23 , HR 0.77, IC95% 0.68-0.90). Pentru a determina o valoare de cut-off, se folosește analiza ROC (*Figura 4*), variabila de referință fiind decesul, iar variabila de clasificare fiind valoarea Hb la internare.

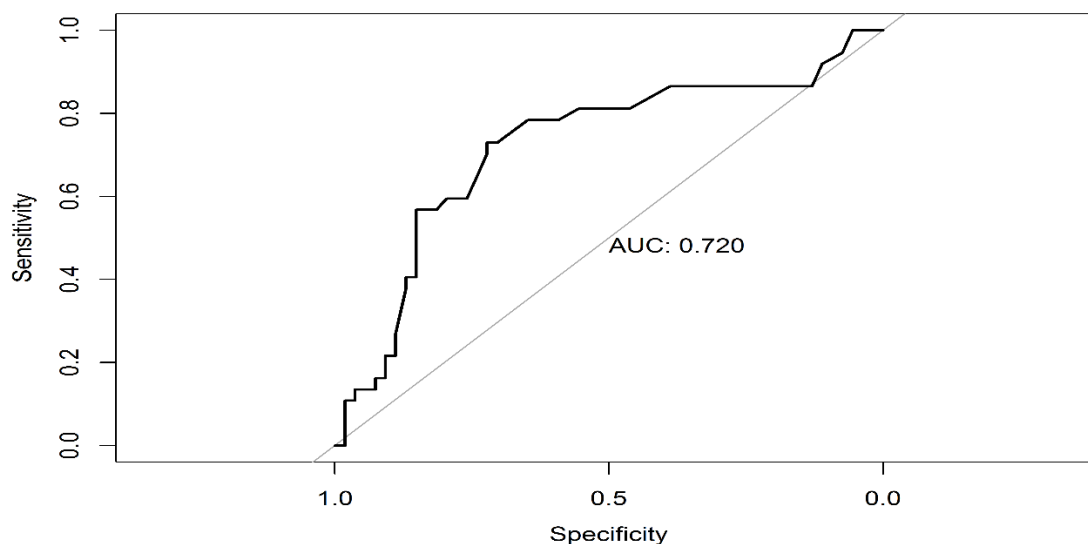


Figura 4 – Analiza ROC privind valoarea hemoglobinei la internare vs deces

Valoarea cut-off a fost calculată folosind algoritmul lui Youden, aceasta fiind 13.15 g/dl și oferind o sensibilitate de 0.73 și o specificitate de 0.72. Cu ajutorul valorii de cut-off, pacienții au fost împărțiți în două categorii: 42 pacienți cu valoarea Hb la internare sub 13.15 g/dl și 49 pacienți cu valoarea Hb la internare egală sau mai mare de 13.15 g/dl. Am analizat supraviețuirea celor două grupuri, comparativ, conform *Figurii 5*.

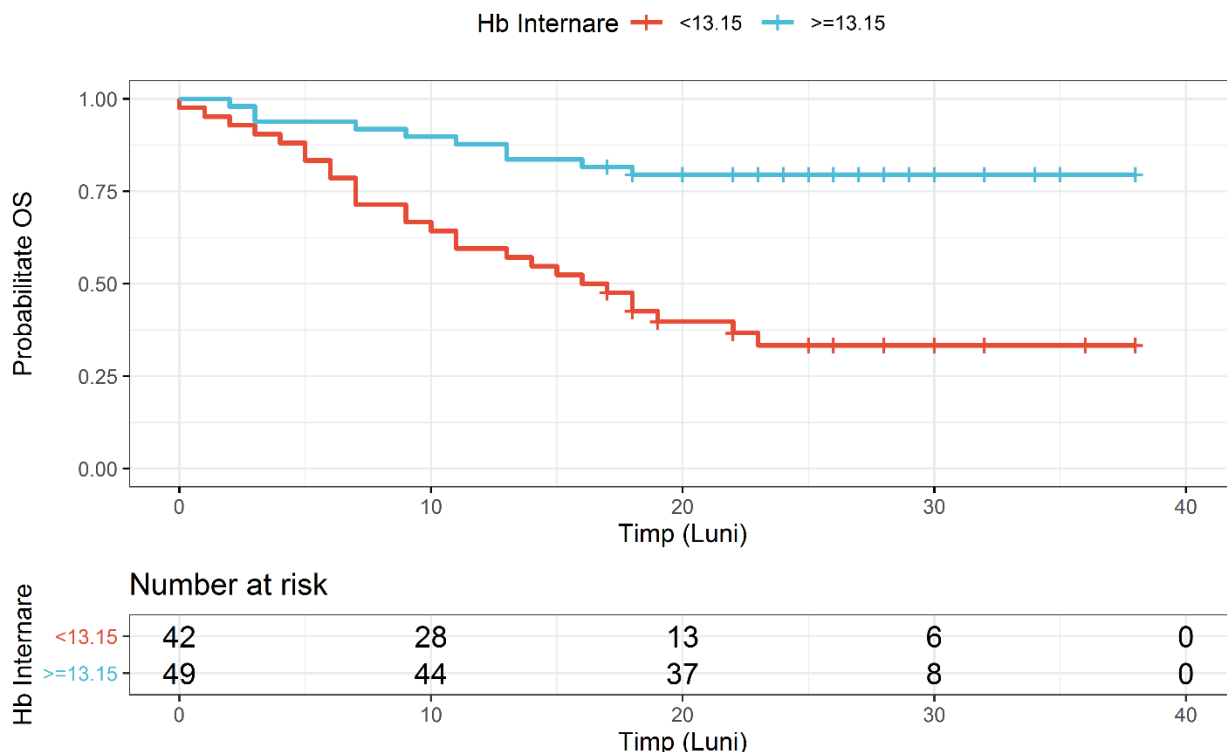


Figura 5 – Curba Kaplan-Meier pentru pacienții cu Hb la internare mai mare sau egală, respectiv, mai mică decât valoarea cut-off

64.28% dintre pacienții care au avut Hb la internare mai mică decât 13.15 g/dl au decedat în timpul urmăririi postoperatorii, având o medie restrictivă a supraviețuirii de 19.8 luni. Din grupul pacienților care au avut, la internare, valoarea Hb mai mare sau egală cu 13.15 g/dl, 20.40% au decedat în timpul follow-up-ului, având o medie restrictivă a supraviețuirii de 32.2 luni. Testul log-rank a arătat că diferențele sunt semnificative statistic ($p < 0.0001$), pacienții cu Hb sub 13.15 g/dl la internare au o rată de deces mai mare și o medie restrictivă mai mică față de pacienții cu valoarea Hb la internare peste 13.15 g/dl.

Comparând valorile hemoglobinei la internare și la externare și aplicând testul Student T, am observat că diferențele sunt semnificative din punct de vedere statistic între aceste valori în funcție de statusul pacienților la sfârșitul perioadei de urmărire ($p < 0.0001$). Astfel, pacienții

decedați din cauze oncologice au avut valori semnificativ mai mici ale hemoglobinei la internare și la externare prin comparație cu pacienții decedați prin alte cauze și cei aflați în viață la sfârșitul perioadei de urmărire.

În ceea ce privește numărul unităților MER transfuzate pacienților în timpul internării, 19 dintre pacienți nu au avut nevoie de transfuzie de masă eritocitară, iar 37 dintre pacienți au avut nevoie de o unitate MER transfuzată. 26 pacienți au avut două unități MER transfuzate în cursul internării, în timp ce restul de 9 pacienți au avut trei unități MER transfuzate din cauza scăderii hemoglobinei. Folosind testul ANOVA, am analizat datele referitoare la necesarul transfuzional al pacienților cu CR și am obținut $p = 0.0038$. Astfel, există diferențe importante între pacienții decedați în cursul urmăririi și cei aflați în viață la sfârșitul acesteia, în ceea ce privește necesarul transfuzional în timpul internării. Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier (Figura 6) arată că supraviețuirea pacienților care au fost transfuzați cu două și trei unități MER este mai scăzută prin comparație cu pacienții care au primit cel mult o unitate MER în timpul internării.

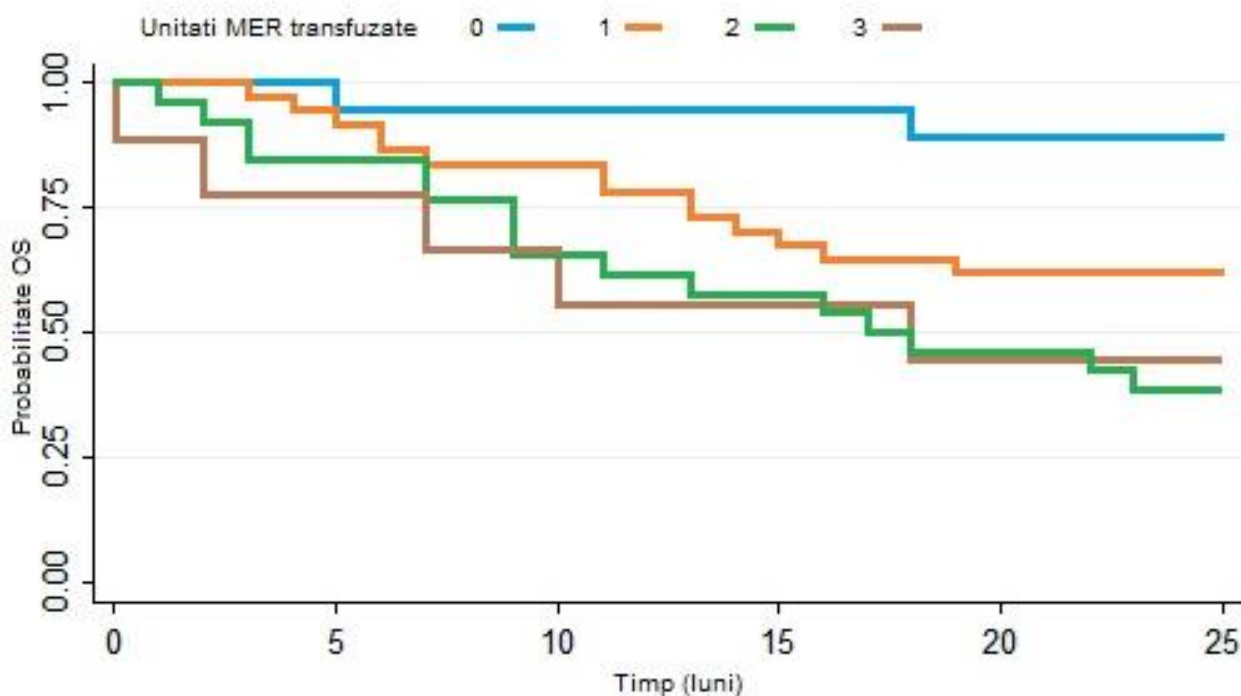


Figura 6 - Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier în funcție de numărul unităților MER transfuzate

Testul log-rank al curbelor de supraviețuire arată că există diferențe importante din punct de vedere statistic ($p = 0.0065$) între pacienții clasificați în funcție de numărul unităților MER transfuzate în timpul internării.

Am analizat influența pe care o are valoarea **creatininei serice** la internare asupra OS, folosind o regresie Cox simplă, ce a arătat că influența este semnificativă statistic ($p=0.0002$, coeficient 0.29, HR 1.34, IC95% 1.14-1.57). Analiza ROC a fost folosită pentru a determina valoarea cut-off, conform *Figurii 7*.

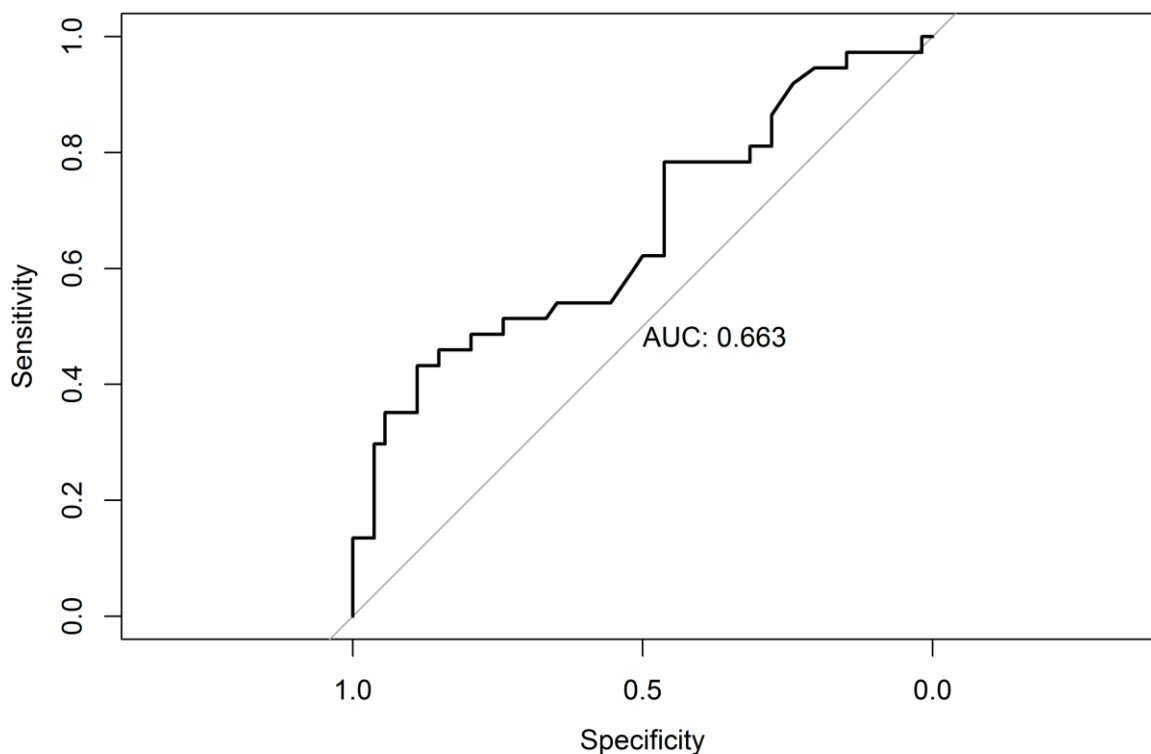


Figura 7 – Analiza ROC privind valoarea creatininei serice la internare vs deces

Valoarea cut-off calculată conform metodei Youden a fost 1.58 mg/dl, returnând o specificitate de 0.88 și o sensibilitate de 0.43. Valoarea cut-off a împărțit lotul analizat în două grupe, respectiv, 69 de pacienți cu valoarea creatininei la internare mai mică decât 1.58 mg/dl și 22 de pacienți cu creatinina serică la internare mai mare sau egală cu valoarea cut-off. Analiza Kaplan-Meier a arătat o supraviețuire mai mare pentru pacienții aflați în grupul cu creatinina serică mai mică decât 1.58 mg/dl, conform *Figurii 8*.

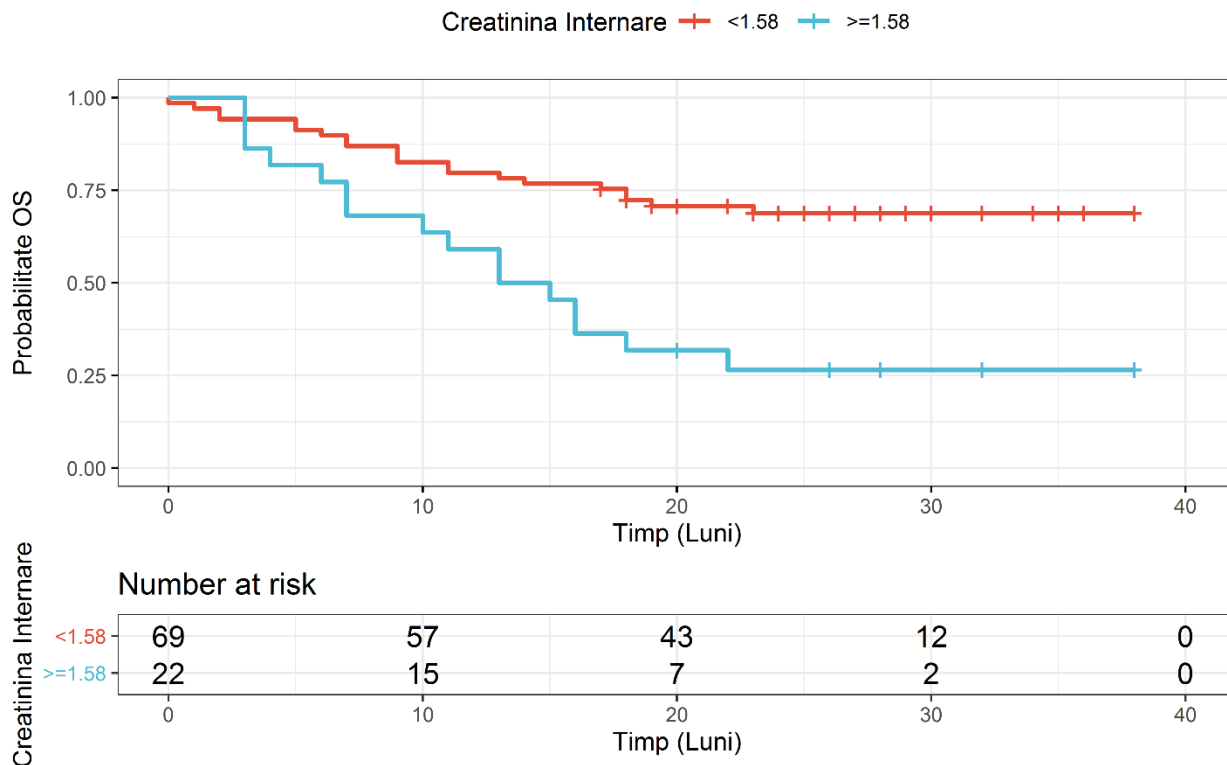


Figura 8 - Analiza Kaplan-Meier a pacienților cu valoarea creatininei la internare sub 1.58 mg/dl vs mai mare sau egală cu 1.58 mg/dl

Diferențele dintre cele două grupuri de pacienți sunt cu semnificație statistică la testul curbelor de supraviețuire log-rank ($p = 0.0002$). Astfel, pacienții cu creatinină serică peste 1.58 mg/dl au o mortalitate mai mare (72.27% vs 30.43%) și o medie restrictivă de supraviețuire mai mică (17.80 luni vs 29.30 luni), în comparație cu restul pacienților.

Analizând valorile creatininei serice la internare și la externare și comparându-le cu ajutorul testului Student T în funcție de evoluția pacienților, am observat că diferențele au fost marginal ne semnificative statistic ($p = 0.0534$), privind relația acestora cu statusul pacienților la sfârșitul perioadei de urmărire.

Influența valorii **Cyfra 21-1 serice** măsurate preoperator asupra OS a fost analizată folosind o regresie Cox simplă, ce a arătat că există semnificație statistică ($p < 0.0001$, coeficient 0.03, HR 1.03, IC95% 1.01-1.04). De asemenea, analiza multifactorială ANOVA a valorii Cyfra 21-1 preoperatorii în funcție de evoluția pacienților a arătat ca există diferențe cu semnificație statistică ($p = 0.0004$) între cele trei clase de pacienți, conform *Figurii 9*.

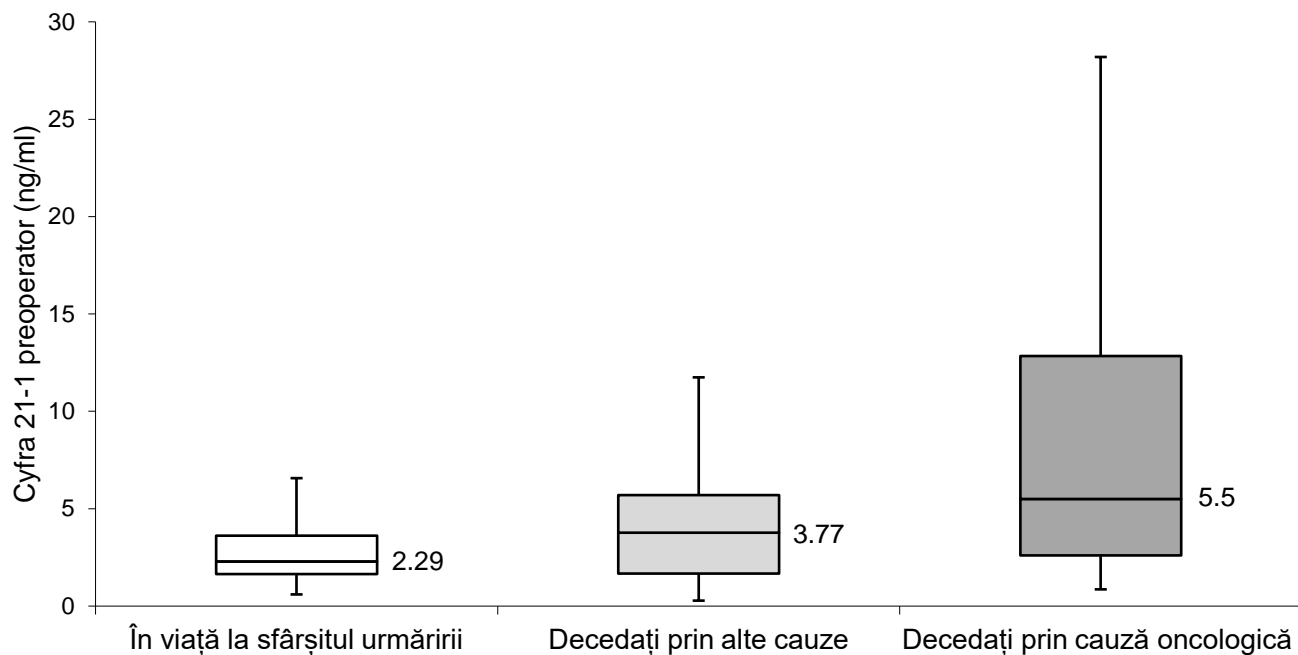


Figura 9 – Valorile Cyfra 21-1 preoperatorii în funcție de evoluția pacienților în timpul urmăririi postoperatorii

În continuare, pentru a determina o valoare de cut-off, este folosită analiza ROC, variabila de referință fiind decesul, iar variabila de clasificare fiind valoarea Cyfra 21-1 serică măsurată preoperator (Figura 10).

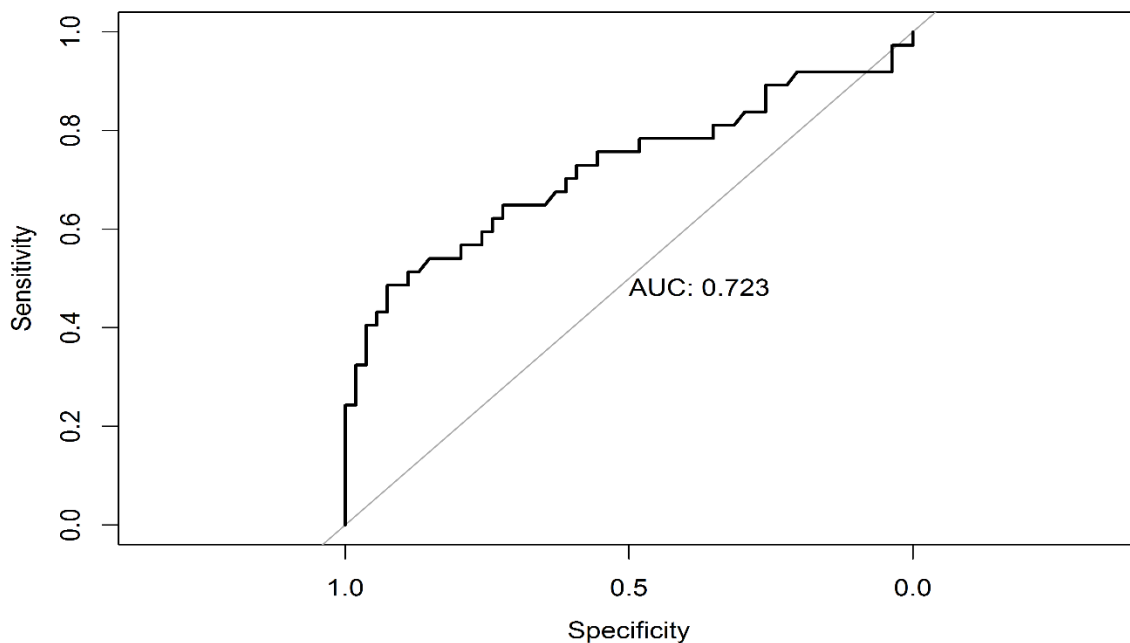


Figura 10 – Analiza ROC a valorii Cyfra 21-1 serice preoperatorii vs deces

Folosind metoda Youden, valoarea de cut-off optimă este 5.27 ng/ml, valoare care îi corespunde o sensibilitate de 0.48 și o specificitate de 0.92. În funcție de valoarea Cyfra 21-1 serice preoperatorii, lotul de pacienți a fost împărțit în două categorii: grupul pacienților cu valori mai mici de 5.27 ng/ml și pacienții cu valori mai mari sau egale cu 5.27 ng/ml, aceste două categorii fiind folosite pentru analiza Kaplan-Meier (Figura 11).

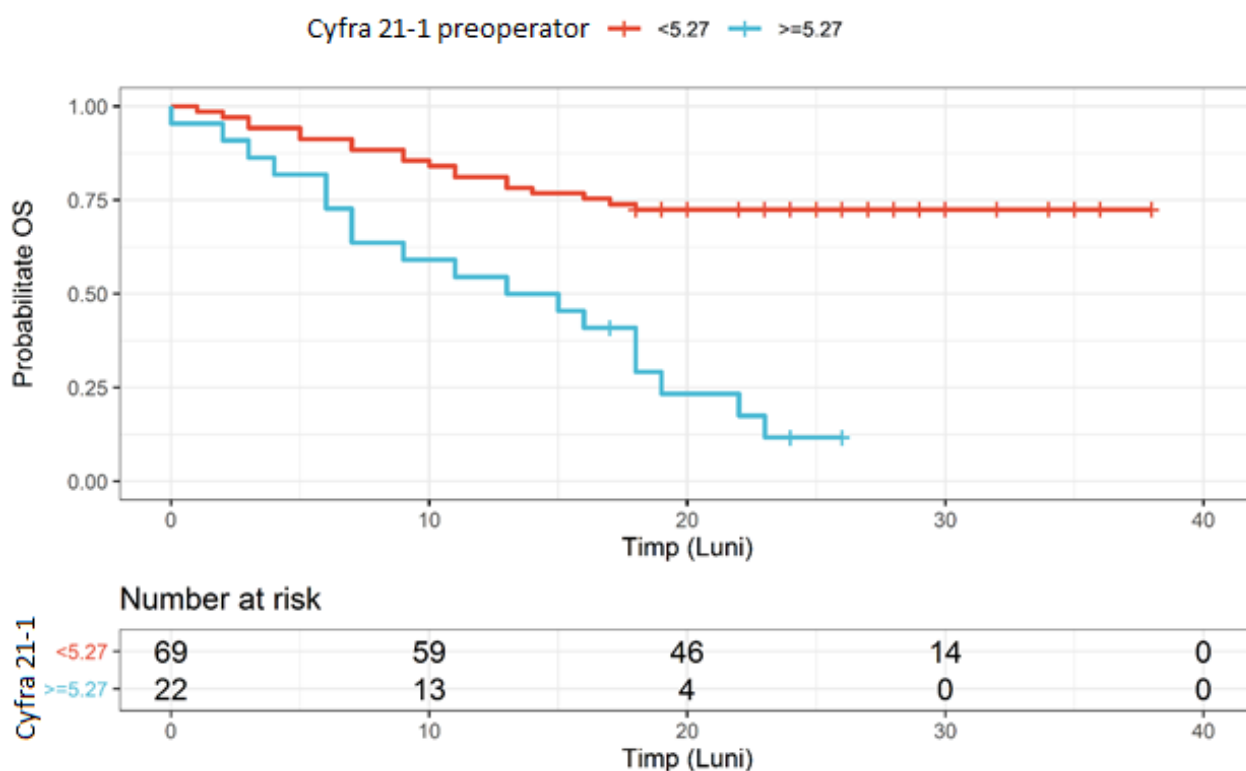


Figura 11 – Analiza Kaplan-Meier comparativă a supraviețuirii pacienților cu valori mai mici de valoarea cut-off și a pacienților cu valori mai mari sau egale cu valoarea cut-off

22 dintre pacienții incluși în cercetare au avut valoarea Cyfra 21-1 serică preoperatorie mai mare sau egală cu 5.27 ng/ml. Din acest grup, 18 pacienți (81.81%) au decedat în cursul urmăririi postoperatorii. Media restrictivă a supraviețuirii pentru acest grup de pacienți a fost de 13.4 luni. În grupul pacienților cu valoarea Cyfra 21-1 serică preoperatorie mai mică decât valoarea cut-off, decesul s-a înregistrat pentru 19 pacienți dintre cei 69 care au fost incluși în grup (27.53%). Media restrictivă a supraviețuirii pentru acești pacienți a fost de 30.1 luni. Testul log-rank al curbelor de supraviețuire a returnat o valoare a $p < 0.0001$.

Am analizat, în continuare, posibilitatea ca valorile Cyfra 21-1 să se coreleze cu alte caracteristici ale pacienților. Astfel, pentru a vedea dacă există diferențe între cele două sexe se

folosește un test Wilcoxon Rank Sum bidirecțional, pentru două eșantioane independente. Mediana valorii Cyfra 21-1 pentru femeile incluse în cercetare a fost de 2.29 ng/ml, în timp ce, pentru bărbați, valoarea a fost de 2.84 ng/ml. Testul folosit ne-a arătat că nu există semnificație statistică între valorile Cyfra 21-1 ale celor două sexe ($p = 0.2737$, IC 95% între -1.90 și 0.35)

Folosind testul Spearman Rho, am analizat capacitatea valorilor serice ale Cyfra 21-1 preoperatorii de a diferenția stadiile tumorale pT. Testul Spearman Rho a relevat că datele noastre au semnificație statistică ($p = 0.002$). Astfel, valoarea mediană a pacienților cu rezultat histopatologic de CUV-NMI a fost 1.78 ng/ml. Pentru pacienții clasificați pT2, mediana valorii Cyfra 21-1 preoperator a fost 2.63 ng/ml, iar pentru pacienții din stadiul pT3, 3.03 ng/ml. Pacienții stadializați pT4 au avut cea mai mare valoare mediană, respectiv 5.56 ng/ml, conform *Figurii 12*.

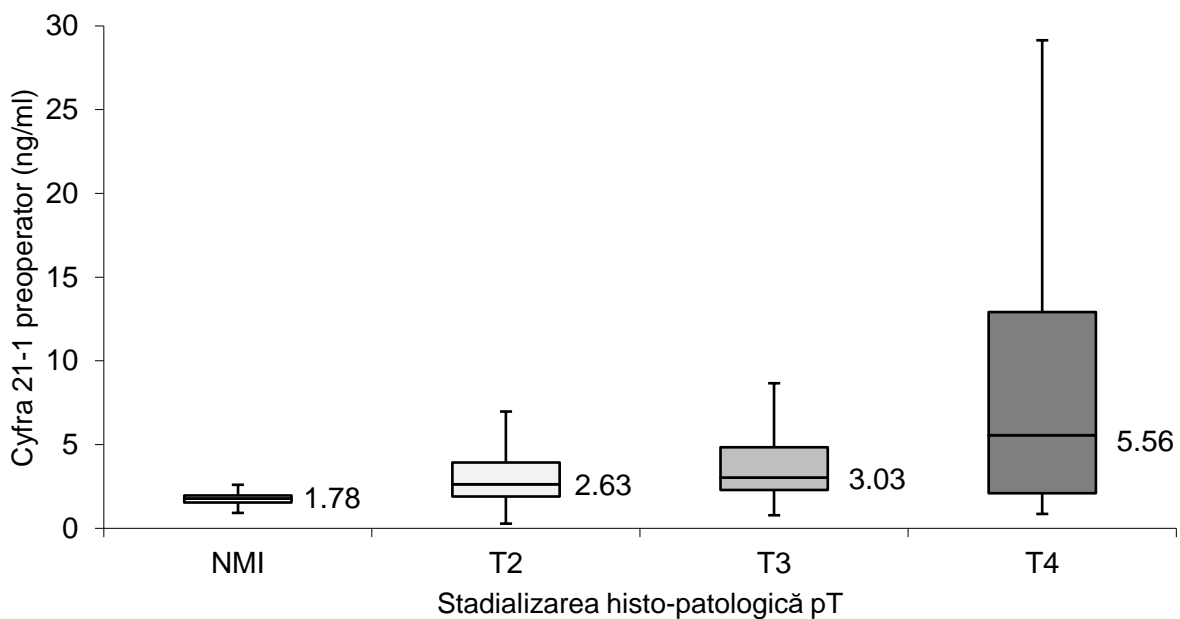


Figura 12 – Variația valorilor preoperatorii ale Cyfra 21-1 în funcție de stadializarea pT

Analiza corelației dintre stadiul pN și valorile Cyfra 21-1 a inclus doar pacienții care au avut limfodisecția ganglionilor loco-regionali efectuată la momentul CR, excluzându-i, astfel, pe cei 20 pacienți stadializați pNx. Testul Spearman Rho a arătat că există semnificație statistică pentru distribuția valorilor Cyfra 21-1 măsurate preoperator și stadializarea pN ($p = 0.0314$). Compararea valorilor măsurate preoperator ale Cyfra 21-1 între pacienții cu CUV LG și CUV HG a arătat o diferență importantă din punct de vedere statistic ($p = 0.0351$). Nu au fost înregistrate diferențe semnificative ale valorilor Cyfra 21-1 între pacienții cu LVI și cei fără

LVI ($p = 0.6419$) și între pacienții cu PNI și cei fără PNI pe piesa de CR ($p = 0.2124$). Pacienții care au fost diagnosticați în stadii metastatice preoperator, nu au avut valorile serice ale Cyfra 21-1 măsurate preoperator semnificativ diferite față de cele ale pacienților non-metastatici ($p = 0.2829$).

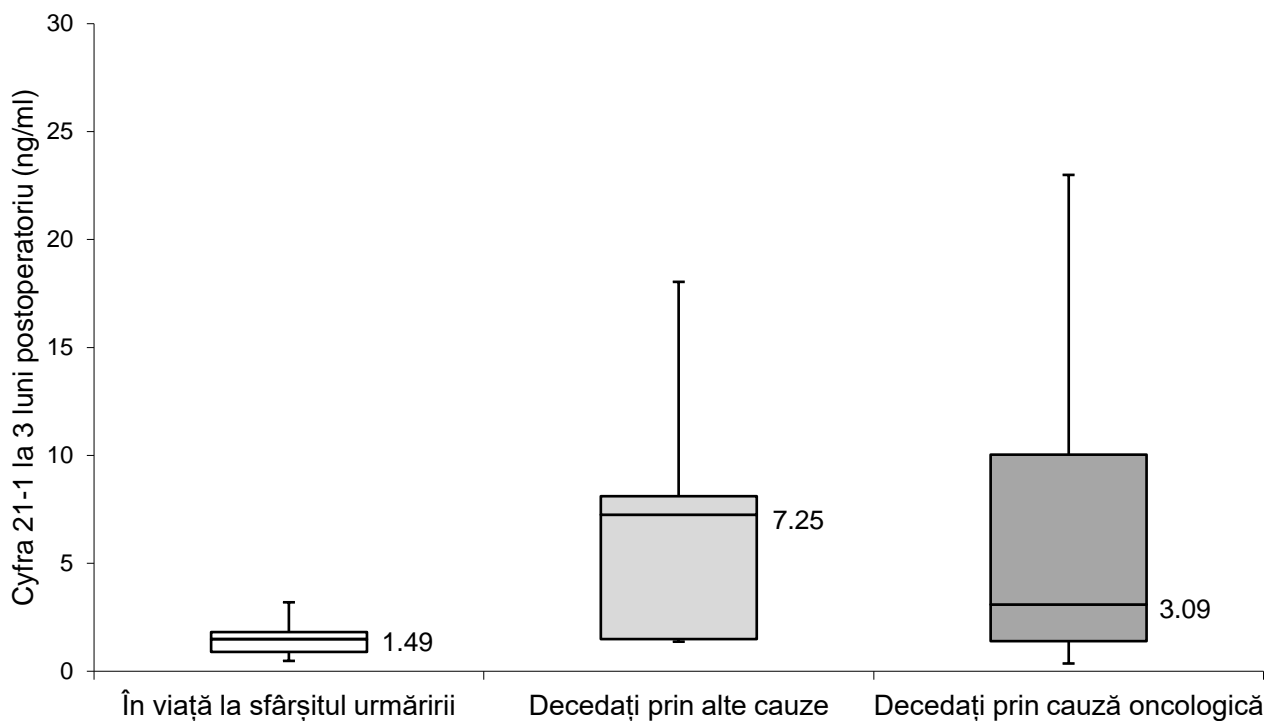


Figura 13 – Determinările la 3 luni postoperatoriu ale Cyfra 21-1 în funcție de evoluția pacienților

Prima determinare a nivelului seric postoperatoriu al Cyfra 21-1 a fost făcută la 3 luni de la CR. Analiza de variație multifactorială ANOVA a găsit diferențe cu semnificație statistică ($p = 0.0415$) între valorile Cyfra 21-1 măsurate la 3 luni postoperatoriu și statusul pacienților la sfârșitul perioadei de urmărire postoperatorii, conform *Figurii 13*.

Cea de-a doua determinare postoperatorie a valorii Cyfra 21-1 a fost făcută la 6 luni de la CR. Analiza ANOVA a arătat că există diferențe semnificative din punct de vedere statistic ($p = 0.0078$) între valorile Cyfra 21-1 în funcție de evoluția postoperatorie a pacienților în perioada de urmărire, conform *Figurii 14*.

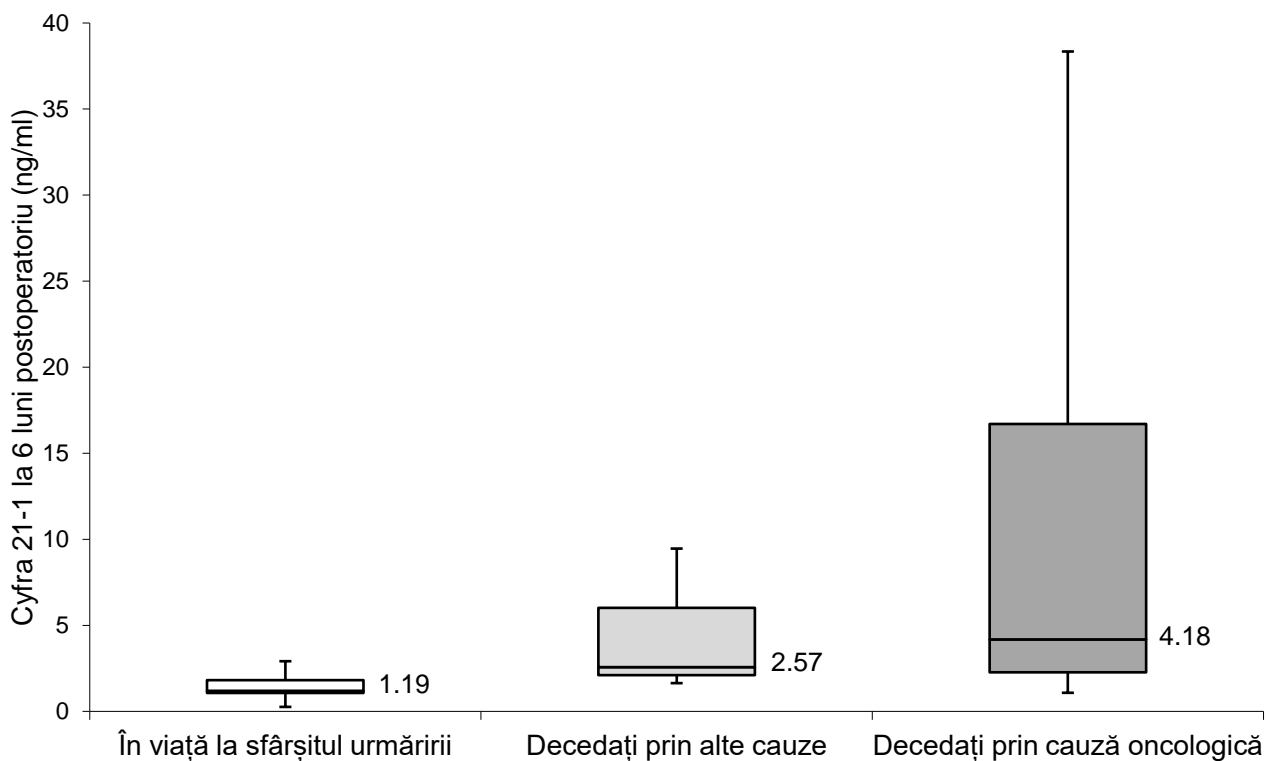


Figura 14 – Valorile Cyfra 21-1 măsurate la 6 luni postoperatoriu în funcție de evoluția pacienților în perioada de urmărire

În mod asemănător analizelor precedente, testul ANOVA aplicat determinărilor la 12 luni postoperatoriu a arătat că există diferențe statistice între cele 3 categorii de pacienți ($p = 0.0105$), însă nu au existat diferențe semnificative în cazul determinărilor efectuate la 18 luni după CR ($p = 0.1409$). Regresia logistică arată că valorile Cyfra 21-1 măsurate preoperator, la 3 luni și 6 luni postoperatoriu sunt capabile să prezică evoluția pacienților (Tabelul 4).

Tabelul 4 – Regresia logistică: supraviețuirea (Deces DA = 1; Deces NU = 0) în funcție de valorile Cyfra 21-1 și momentul determinării acestui parametru

Momentul determinării Cyfra 21-1	N	OR	IC 95%	p
Preoperator	91	1.29	1.09 - 1.29	0.003
Postoperatoriu la 3 luni	59	1.61	1.14 – 1.61	0.007
Postoperatoriu la 6 luni	44	2.30	1.10 – 2.30	0.028
Postoperatoriu la 12 luni	22	2.05	0.69 – 2.05	0.198
Postoperatoriu la 18 luni	14	3.90	0.66 – 3.90	0.133

În design-ul studiului, valorile Cyfra 21-1 urmau să fie măsurate la 3, 6, 12 și 18 luni postoperatoriu, pentru a vedea evoluția acestora. Din cauza faptului că o parte dintre pacienți nu au fost complianți la măsurarea valorilor Cyfra 21-1 postoperatorii (numărul celor pierduți a fost direct proporțional cu perioada scursă de la intervenția chirurgicală) precum și din cauza decesului unora dintre pacienți, am reușit să adunăm date suficiente doar pentru un singur moment, precoce, la 3 luni postoperatoriu. Astfel, comparația s-a făcut pe un număr de 59 de pacienți, pentru care au fost disponibile ambele valori ale Cyfra (preoperatorie și postoperatorie). Deoarece numărul de pacienți a fost suficient de mare, teorema limitei centrale poate fi aplicată și se pot folosi testele parametrice, indiferent de apropierea / depărtarea de distribuția gaussiană a distribuțiilor empirice ale celor două variabile. Testul folosit, "Paired – T test two-sided " – "Test T bidirecțional pentru eșantioane perechi" a arătat că nu există diferențe semnificative statistice ($p = 0.6971$, medie diferențe 0.58 ng/ml , IC95% $-2.41 - 3.58 \text{ ng/ml}$) între valorile preoperatorii ale Cyfra 21-1 (media valorilor fiind 5.55 ng/ml) și valorile măsurate la 3 luni postoperatorii ale Cyfra 21-1 (media valorilor fiind 4.97 ng/ml).

Totuși, la 19 dintre cei 59 pacienți analizați (32.2%), valoarea serică a Cyfra 21-1 măsurată la 3 luni de la CR, a crescut. Dintre cei 19 pacienți la care valoarea Cyfra 21-1 a crescut, 10 bolnavi au decedat în cursul urmăririi postoperatorii. Diferența între valoarea Cyfra măsurată postoperatoriu la 3 luni și valoarea preoperatorie a acestor pacienți a fost în medie de 10.7 ng/ml , semnificativ mai mare ($p < 0.0001$) decât cea a celor 9 pacienți aflați în viață la sfârșitul follow-up-ului la care Cyfra 21-1 a crescut postoperator (creștere medie cu 0.73 ng/ml a valorii Cyfra 21-1).

O alternativă la analiza de supraviețuire de tip Kaplan-Meier este regresia Cox, care, spre deosebire de analiza Kaplan-Meier ce ne furnizează informații ca mediana supraviețuirii sau media supraviețuirii, ne permite să estimăm ratele de hazard (HR = hazard ratio) asociate cu diverși predictorii. Rata de hazard este definită ca numărul de evenimente (decese) pe unitatea de timp, împărțită la numărul de pacienți la risc (rata de hazard instantanee este limita acestui raport). Am folosit în studiu o regresie Cox simplă, folosind predictorii cu semnificație statistică la analiza de supraviețuire Kaplan-Meier, conform *Tabelului 5*.

Tabelul 5 – Analiza Cox a factorilor ce influențează supraviețuirea, cu semnificație statistică la analiza Kaplan-Meier

Predictor	Valoare p	HR	IC 95%
Sexul Masculin	0.0239	5.17	1.24 – 21.52
Scorul CCI ≥ 1	0.0454	1.34	1.01 – 2.13
Expunerea la factori de risc ocupaționali	0.0433	2.66	1.03 – 7.11
Stadiul clinic T \geq cT3	0.0427	3.41	1.05 – 19.03
Stadiul clinic N \geq cN2	0.0255	2.15	1.10 – 8.43
Stadiul patologic T \geq pT3	0.0008	5.30	2.06 – 14.77
Stadiul patologic N \geq pN2	0.0013	3.13	1.62 – 9.12
Stadiul Metastatic Preoperator	0.0019	3.19	1.55 – 7.05
Diferențierea Sincițiotrofoblastică	0.0001	6.76	2.52 – 18.13
Cyfra 21-1 Preoperator	< 0.0001	1.03	1.01 – 1.04
Hemoglobina preoperatorie	0.0005	0.78	0.68 – 0.90
Creatinina serică preoperatorie	0.0002	1.34	1.14 – 1.57
Transfuzia de MER ≥ 1 unitate	0.0155	5.91	1.42 – 16.58

Regresia Cox a identificat 13 factori de risc asociați decesului pacienților incluși în studiu. Sexul masculin, stadiul patologic \geq pT3, diferențierea sincițiotrofoblastică și transfuzia a cel puțin o unitate MER sunt predictorii ce cresc cu cel puțin 5 ori riscul de deces.

În continuare, a fost utilizată o regresie Cox multivariată folosind următorii parametri: Hemoglobina la internare, diferențierea sincițiotrofoblastică a tumorii, valoare serică a Cyfra 21-1 preoperatorie și prezența determinărilor secundare la evaluarea preoperatorie (Tabelul 6).

Tabel 6 – Identificarea factorilor de risc independenți asociați cu decesul pacienților, conform regresiei Cox multivariate

Predictor	Valoare p	HR	IC 95%
Hemoglobina la Internare	0.0029	0.77	0.67 – 0.92
Diferențierea Sincițiotrofoblastică	0.0002	7.12	2.46 – 20.58
Cyfra 21-1 Preoperator	0.0008	1.02	1.01 – 1.04
Stadiul Metastatic Preoperator	0.0200	2.66	1.16 – 6.09

Toți parametrii analizați au fost asociați cu prognosticul rezervat al pacienților, aceștia fiind factori independenți de prognostic pentru deces. Valorile hemoglobinei la internare și a Cyfra 21-1 măsurate preoperator au fost factori importanți de prognostic în lotul analizat. De asemenea, prezența determinărilor secundare și, mai ales, a diferențierii sincițiotrofoblastice pe piesa de CR au crescut HR de 2.66 ori ($p = 0.02$), respectiv de 7.12 ori ($p = 0.0002$).

Pentru a verifica dacă stadiul metastatic și valorile Cyfra 21-1 rămân un predictor important în timp, se analizează un model Nelson-Aalen (care, spre deosebire de modelul Cox, este aditiv și permite variații ale coeficientului). Modelul Nelson-Aalen calculează coeficienți și pantele funcțiilor cumulative de hazard, conform Tabelului 7.

Tabelul 7 – Parametrii analizați în modelul Nelson-Aalen și semnificația lor statistică

Factor de Hazard	Panta	Coeficient	Valoare p
Cyfra Preoperator	0.004	0.0009	0.0399
Stadiul M1 vs M0	0.08	0.02	0.0311

Se observă că și în modelul Nelson-Aalen semnificația factorilor de hazard este păstrată ($p < 0.05$), iar evoluția în timp a funcțiilor de hazard pentru predictorii este redată în Figura 15.

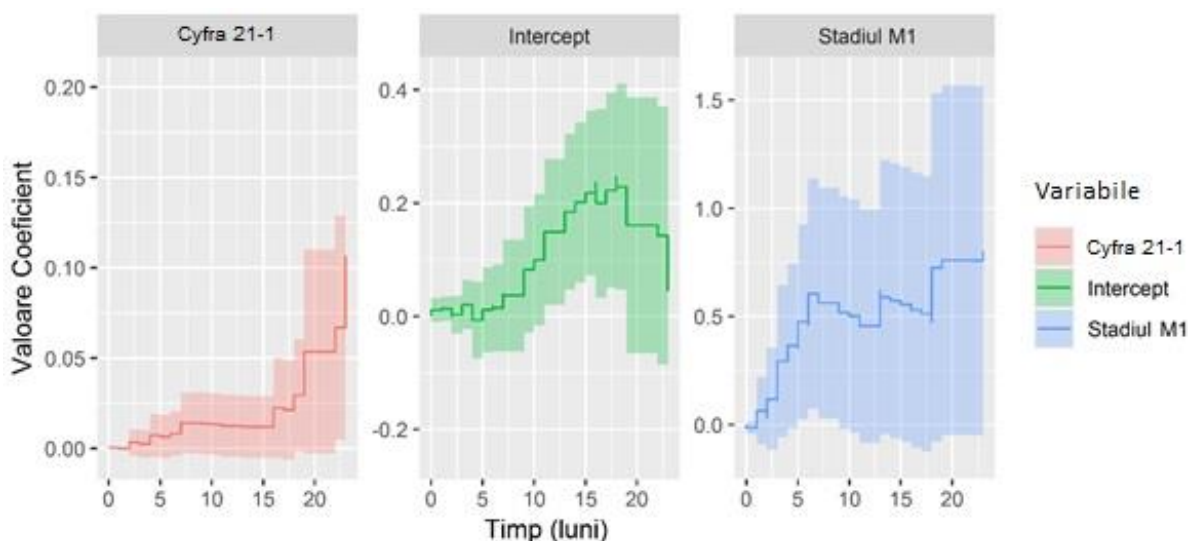


Figura 15 – Analiza Nelson-Aalen a factorilor cumulativi de hazard

Graficul ne arată că valoarea Cyfra 21-1 are o influență scăzută în primele luni postoperatorii, apoi urmează o creștere cu o pantă mică până la aproximativ 15 luni, după care observăm o creștere abruptă, factorul de hazard fiind important în perioada tardivă a evoluției bolii neoplazice. Prezența determinărilor secundare este asociată cu o funcție cumulativă a hazardului cu o pantă abruptă în primele 6 luni, după care evoluția este "în dinți de ferăstrău",

funcția cumulativă a hazardului fiind relativ constantă. Nu este de interes evoluția în cazul interceptului, acesta reprezentând evoluția constantei din modelul aditiv, care nu are vreo utilitate clinică.

Discuții

Managementul pacienților cu CUV și indicație de CR este unul complicat, date fiind amploarea intervenției chirurgicale, ratele crescute de incidente intra-operatorii și complicații postoperatorii, dar și afectarea calității vieții pacienților. Identificarea unor parametri care pot prezice evoluția postoperatorie a pacienților și, implicit, prognosticul acestora, este foarte utilă în stabilirea indicațiilor de tratament care să fie în beneficiul pacientului.

În ceea ce privește datele demografice ale pacienților incluși în studiu, vârsta medie a acestora a fost asemănătoare cu datele publicate în literatura de specialitate [15], în timp ce raportul pe sexe s-a încadrat în limitele ratelor de incidență și prevalență în funcție de sex ale CUV [16]. În analiza lotului studiat, vârsta a fost un factor de risc pentru deces prin alte cauze decât cele oncologice, în timp ce supraviețuirea pacienților de sex masculin a fost mult mai mică decât cea a femeilor incluse în studiu. În mod contrar, datele din literatură susțin că supraviețuirea femeilor cu CUV este mai mică prin comparație cu cea a bărbaților, în ciuda faptului că incidența la sexul feminin este de 4-5 ori mai scăzută [17,18].

Un procent crescut de pacienți (14.3%) a avut determinări secundare identificate imagistic înainte de efectuarea CR. O mare parte dintre pacienții metastatici au avut nevoie de CR din cauza anemiei secundare hematuriei sau din cauza sindromului vezical accentuat dat de tumora locală. În țările cu sisteme dezvoltate de sănătate, acești pacienți beneficiază de tratamentul paliativ, chimioterapic, radioterapeutic și imunomodulator. În țara noastră, însă, accesibilitatea acestor tipuri de tratament pentru pacienți este scăzută, iar bolnavii nu pot beneficia imediat de tratament în vederea ameliorării simptomatologiei și a creșterii calității vieții.

Rezultatul histo-patologic a clasificat un sfert dintre pacienți în stadiul pT4 și mai mult de o treime, în stadiul pT3. Acest lucru este cauzat de întârzierea cu care medicii urologi îndrumă pacienții către clinicile terțiare de chirurgie urologică, cu o vastă experiență în CR, dar și de complianță scăzută a unora dintre bolnavi. Majoritatea pacienților nu a prezentat ganglioni pozitivi la limfodiseția ilio-obturatorie, deși stadializarea preoperatorie imagistică a indicat prezența adenopatiilor loco-regionale pentru 68.1% dintre pacienți. Analiza Kaplan-Meier în

funcție de stadializarea pN a arătat că supraviețuirea cea mai scăzută este înregistrată de către pacienții la care nu s-a practicat evidare ganglionară, curba pacienților pNx fiind asemănătoare pacienților stadializați pN2. Acest lucru susține lipsa unui beneficiu semnificativ obținut în urma exciziei adenopatiilor multiple decelate intraoperator la pacienții paliativi față de pacienții clasificați pN2. Important de menționat este că, spre deosebire de datele din literatură, în cadrul acestei cercetări, supraviețuirea pacienților stadializați pN3 a fost superioară celor stadializați pN2, din cauza faptului că doar patru dintre pacienții incluși prospectiv în studiu au fost clasificați pN3 și, astfel, designul cercetării a fost unul dezechilibrat.

Descoperirea incidentală a unui focar de adenocarcinom prostatic pe piesa de CR a fost raportată la 13.2% dintre pacienți, ceea ce se încadrează în limitele cuprinse între 7% și 24% descrise în literatura de specialitate [19]. Prognosticul pacienților cu CUV și focar de adenocarcinom prostatic nu a fost influențat de către prezența neoplasmului prostatic, acesta fiind nesemnificativ din punct de vedere clinic.

Prezența unor tipuri de diferențiere tumorală a CUV care sunt asociate cu prognosticul rezervat, a fost mai crescută prin comparație cu datele din literatură. Remarcăm atât prezența diferențierii sincițiotrofoblastice la 5.5% dintre pacienți, cât și a CUV cu arii de carcinom cu celule în cuiburi („nested”) la 2.2% dintre bolnavii incluși în studiu. De asemenea, procente mai mari decât cele raportate în literatură au fost înregistrate pentru CUV cu arii de comedocarcinom (6.6%), CUV cu diferențiere sarcomatoidă (1.1%) și CUV cu diferențiere plasmocitoidă (1.1%) [20]. Diferențierea sincițiotrofoblastică a CUV s-a dovedit a fi un factor independent de prognostic pentru supraviețuire, analiza multivariată returnând o valoare $p = 0.0002$. Două dintre caracteristicile tumorale ce sunt asociate cu prognosticul rezervat, LVI și PNI, au fost întâlnite la 61.5% și, respectiv, 42.9% dintre pacienți, procente semnificativ mai mari decât cele întâlnite în datele din literatură [21]. În concluzie, parametrii histo-patologici care se asociază cu un prognostic rezervat al pacienților s-au întâlnit într-un procent crescut în lotul studiat.

Rata de supraviețuire a pacienților în timpul perioadei de urmărire este mai mică decât media raportată în literatură [12–14], iar perioada de urmărire a pacienților a fost una relativ scăzută, cu o medie de 26.5 luni de urmărire postoperatorie. Unul dintre motivele pentru care pacienții au avut rate de supraviețuire mai mici, este procentul crescut de factori de prognostic nefavorabil întâlnit în lotul de pacienți analizat.

Evaluarea preoperatorie și postoperatorie a parametrilor bio-chimici a arătat că aceștia sunt factori de prognostic pentru pacienții din lotul analizat. Valoarea preoperatorie a hemoglobinei a fost studiată în mai multe articole, autorii stabilind că acesta are un rol prognostic important [22]. Cu toate acestea, valoarea cut-off a hemoglobinei preoperatorii este diferită în studiile din literatura de specialitate. Majoritatea autorilor au folosit valoarea minimă normală a celei stabilite de laborator în funcție de reactivii folosiți, ceea ce ar putea crea diferențe importante între pacienți. În cadrul analizei noastre, am ales analiza ROC și metoda Youden de stabilire a valorii cut-off optimale pentru a împărți lotul de pacienți în două grupe – pacienții cu Hb mai mică decât valoarea cut-off și pacienții cu Hb mai mare sau egală cu valoarea cut-off. Astfel, curbele Kaplan-Meier au arătat că există o diferență importantă de supraviețuire între cele două grupuri de pacienți, valoarea Hb la internare de cel puțin 13.15 g/dl fiind un factor ce se corelează pozitiv cu creșterea ratei de supraviețuire. Diferențele între valorile hemoglobinei la internare și la externare se corelează cu evoluția postoperatorie a pacienților cu CR, astfel încât, pacienții decedați prin cauze oncologice în timpul urmăririi postoperatorii au valori semnificativ mai mici decât restul pacienților ($p < 0.0001$). Conform analizei multivariate, valoarea hemoglobinei la internare este un factor de prognostic independent pentru evoluția postoperatorie a pacienților cu CR, incluși în studiu.

Transfuziile efectuate în timpul internării au fost un factor de prognostic nefavorabil pentru evoluția pacienților cu CR, așa cum arată și literatura de specialitate [23]. Numărul unităților MER transfuzate a fost, de asemenea, un important predictor pentru evoluția pacienților după CR. Astfel, pacienții cu o unitate MER administrată în cursul internării au avut un prognostic nefavorabil față de cei care nu au fost transfuzați, în timp ce pacienții care au avut nevoie de două sau trei unitați MER au avut cea mai scăzută supraviețuire din întreg lotul de pacienți.

Datele din literatură arată că valoarea preoperatorie crescută a creatininei serice și prezența unei patologii cronice renale au rol predictiv pentru evoluția oncologică nefavorabilă a pacienților după CR [24]. În mod similar, am folosit analiza ROC și metoda Youden pentru a stabili valoarea cut-off care ne-a permis împărțirea pacienților în două grupe. Astfel, am arătat că există diferențe semnificative statistice ale supraviețuirii pacienților cu valori mai mari sau egale cu 1.58 mg/dl ale creatininei serice la internare și pacienții cu creatinina serică mai mică de 1.58 mg/dl ($p = 0.0002$).

Cyfra 21-1 a fost studiat ca potential biomarker seric în numeroase tipuri de neoplasme – pulmonar, colo-rectal, oro-faringian, gastric, mamar etc. În ceea ce privește studiile la pacienții cu CUV, el a fost evaluat, în principal, ca marker diagnostic, fiind dozat atât în ser cât și în urină. Studiile publicate până acum pun în lumină date contradictorii cu privire la capacitatea acestui biomarker de a fi utilizat în diagnosticul tumorilor vezicale. Evaluarea Cyfra 21-1 seric, ca potențial marker de prognostic la pacienții cu CR pentru CUV, este unul dintre elementele noi aduse de către studiul nostru, ce nu se regăsesc în literatura de specialitate. Rezultatele noastre susțin capacitatea acestui biomarker de a prezice evoluția postoperatorie a pacienților cu CUV tratați prin CR. Valoarea cut-off a Cyfra 21-1 serice măsurate preoperator de 5.27 ng/ml a împărțit pacienții în două clase cu rate de supraviețuire diferite și curbe Kaplan-Meier diferite din punct de vedere statistic ($p < 0.0001$). Valoarea medie preoperatorie a Cyfra 21-1 seric a fost mai mare decât valorile publicate în literatura de specialitate, din cauza criteriilor de includere diferite pe care le-a avut acest studiu (pacienți cu CUV și indicație de CR). Analiza noastră a evidențiat că există corelații importante între valorile serice măsurate preoperator ale Cyfra 21-1 și stadializarea pT ($p = 0.002$), stadializarea pN ($p = 0.0314$) sau gradul de diferențiere tumorală ($p = 0.0351$). În cursul urmăririi postoperatorii, o parte dintre pacienți nu a fost compliantă la monitorizarea valorilor serice ale Cyfra 21-1, astfel încât, numărul de determinări efectuate postoperatoriu a scăzut atât din cauza acestor pacienți, cât și din cauza pacienților decedați. Cu toate acestea, regresia logistică a arătat că valorile măsurate preoperator și postoperatoriu la 3 și la 6 luni de la CR, au rolul de a prezice supraviețuirea pacienților incluși în studiu. Totodată, creșterea semnificativă a valorilor măsurate la 3 luni postoperatoriu ale Cyfra 21-1, față de valorile preoperatorii, au fost asociate cu supraviețuirea scăzută și prognosticul rezervat. Analiza multivariată a arătat că valoarea serică preoperatorie a Cyfra 21-1 este un factor independent de prognostic pentru pacienții cu CR.

Analiza univariată a identificat 13 factori de risc ce s-au asociat cu decesul pacienților și prognosticul nefavorabil, în timp ce analiza multivariată a confirmat impactul a patru dintre aceștia asupra supraviețuirii pacienților incluși în studiu. De asemenea, modelul Nelson-Aalen a arătat că factorii de risc analizați își mențin influența în timp.

Rezultatele obținute în această analiză au rolul de a propune un panel nou de factori de risc asociați cu decesul pacienților cu CUV tratați prin CR. Punctul forte al analizei noastre îl reprezintă includerea Cyfra 21-1 serice printre cei mai importanți biomarkeri cu rol în stabilirea

prognosticului pacienților cu CUV. Cu toate acestea, rezultatele trebuie interpretate în contextul unui număr relativ mic de pacienți analizați și a unui procent crescut de pacienți aflați în stadii avansate ale bolii sau cu tumori ce prezintă caracteristici ce influențează negativ evoluția postoperatorie.

STUDIUL NR 2 – ANALIZA PROFILULUI MICRO-ARN LA PACIENȚII CU CISTECTOMIE RADICALĂ PENTRU CARCINOM UROTELIAL VEZICAL

Analiza genetică și moleculară a diferitelor tipuri tumorale care afectează diferite organe este o preocupare permanentă în rândul cercetătorilor cu activitate în cadrul biologiei moleculare. În ciuda faptului că au fost publicate numeroase studii în ultima decadă, ce au avut ca scop identificarea caracteristicilor moleculare și genetice ale CUV, mecanismul de apariție și de progresie neoplazică nu este complet elucidat. Scopul cel mai important, ce sperăm că va fi atins într-un viitor nu foarte îndepărtat, este reprezentat de abordarea multimodală, particularizată fiecărui tip tumoral în funcție de caracteristicile sale biomoleculare. Descoperirea unor markeri biomoleculari cu rol în stabilirea diagnosticului sau prognosticului pacienților cu CUV este un pas important către stabilirea de noi ținte terapeutice și dezvoltarea unor tipuri de tratament personalizate fiecărui pacient. Interesul crescut din ultimii ani pentru descoperirea unor biomarkeri cu rol diagnostic sau prognostic în tumorile vezicale, a dus la publicarea multor studii în literatura de specialitate care au analizat structura genomică a CUV.

Până în prezent, au fost descoperite peste 1900 specii diferite de micro-ARN uman și sunt în continuare studiate pentru a înțelege mai bine mecanismele lor de acțiune și rolul lor în diferite procese celulare. Relația dintre speciile de micro-ARN și mecanismele de genază tumorală, proliferare celulară, angiogeneza tumorală și metastazare ale CUV au fost studiate în numeroase articole publicate în ultimii 10 ani. Cercetările inițiale legate de acțiunea speciilor micro-ARN asupra CUV sunt, în mare parte, promițătoare și rezultatele publicate în literatura de specialitate au constituit motivația ce a stat la baza efectuării acest studiu. Majoritatea articolelor publicate în literatura de specialitate analizează influența pe care o au una sau două specii de micro-ARN asupra CUV. În cadrul acestei lucrări de doctorat, am ales să studiem expresia unui panel complex de specii micro-ARN format atât din specii care au mai fost

analizate până acum, cât și specii de micro-ARN care au fost insuficient analizate. Astfel, am selectat 7 specii diferite de micro-ARN: miR-124, miR-126, miR-139, miR-145-3p, miR-145-5p, miR-152 și miR-182.

Scopul principal al acestui studiu a fost evaluarea profilului micro-ARN al pacienților incluși în studiu pentru a evidenția diferențe între expresia speciilor de micro-ARN la nivel tumoral, prin comparație cu țesutul normal și stabilirea influenței expresiei micro-ARN asupra supraviețuirii pacienților. Scopul secundar a fost reprezentat de corelarea expresiei speciilor de micro-ARN cu parametrii cu rol predictiv ai lotului de pacienți incluși în studiu.

Rezultate și Discuții

Expresia miR-124 normalizată cu ajutorul controlului endogen prin metoda Livak ne arată că valoarea FC, calculată conform formulei $2^{-\Delta\Delta CT}$, este mai mică decât 1 pentru 71 dintre pacienți, iar restul de 20 pacienți au avut valoarea FC mai mare ca 1. MiR-126 a fost subexprimat la nivel tumoral pentru toți pacienții, cu excepția unui singur pacient care a avut o valoare FC mai mare decât 1. Expresia miR-139 normalizată cu ajutorul controlului endogen prin metoda Livak ne arată că valoarea FC este mai mare decât 1 doar în cazul a trei dintre pacienți, restul având subexpresia tumorală a miR-139 (FC mai mică decât 1). Majoritatea pacienților a avut subexpresia tumorală a miR-145-3p, doar 10 pacienți având expresia ajustată conform metodei Livak mai mare decât 1.

Expresia miR-145-5p normalizată cu ajutorul controlului endogen prin metoda Livak ne arată că valoarea FC, calculată conform formulei $2^{-\Delta\Delta CT}$, este mai mare decât 1 doar în cazul a doi dintre pacienții incluși în studiu, restul având subexpresia tumorală a miR-145-3p (FC mai mică decât 1). Toți pacienții analizați au avut subexpresia tumorală a miR-152 cu excepția unui singur pacient, care a avut o valoare a FC mai mare decât 1. Expresia ajustată a miR-182 ne arată că valoarea FC este mai mică decât 1 doar în cazul a opt pacienți, restul având supraexpresia tumorală a miR-182 (FC mai mare decât 1).

Analiza profilului micro-ARN ne sugerează că miR-182 poate avea un rol oncogenic în CUV, așa cum susțin și studiile recente din literatură, în timp ce restul speciilor micro-ARN analizate pot avea un rol supresor tumoral. Niciunul dintre parametrii profilului micro-ARN nu s-a corelat cu supraviețuirea pacienților incluși în studiu.

Corelațiile dintre factorii de risc asociați apariției CUV și expresia speciilor micro-ARN sunt reprezentate în *Tabelul 8*. Am folosit valorile FC, ale expresiei ajustate, normalizate a

profilului micro-ARN pentru a evalua relația acestora cu factorii de risc identificați pentru fiecare pacient inclus în studiu.

Tabel 8 – Corelațiile dintre expresia ajustată a speciilor micro-ARN și factorii de risc identificați pentru apariția CUV

Micro-ARN	Fumat		Infecții de tract urinar		Factori de risc genetici		Factori de risc ocupaționali	
	r	p	r	p	r	p	r	p
miR-124	-0.194	0.0653	-0.049	0.6387	0.006	0.9528	0.069	0.5150
miR-126	0.052	0.6211	0.071	0.4984	0.062	0.5542	-0.065	0.5358
miR-139	0.018	0.8604	-0.123	0.2437	0.015	0.8825	-0.096	0.3649
miR-145-3p	-0.056	0.5917	0.006	0.9492	-0.013	0.9000	-0.1753	0.0964
miR-145-5p	0.034	0.7439	0.050	0.6330	-0.056	0.5946	-0.177	0.0932
miR-152	-0.093	0.3809	-0.096	0.3634	0.163	0.1220	-0.037	0.7270
miR-182	0.159	0.1314	-0.029	0.7807	0.072	0.4947	0.104	0.3265

Niciuna dintre expresiile speciilor micro-ARN nu s-a corelat semnificativ ($p < 0.05$) cu prezența unui factor de risc identificat la pacienții incluși în studiu. Cu toate acestea, rezultate marginal ne semnificative (p cuprins între 0.05 și 0.10), corelații negative și indici care arată prezența unei corelații slabe s-au obținut în cazul relației dintre fumat și miR-124 și dintre factorii de risc ocupaționali și miR-145-3p și miR-145-5p. Având în vedere că fumatul este principalul factor de risc pentru apariția CUV și că miR-124 este una dintre speciile de micro-ARN implicate în carcinogeneza CUV, miR-124 ar putea constitui unul dintre mecanismele biomoleculare de apariție și dezvoltare ale CUV la pacienții fumători. Cu toate că rezultatele noastre sunt marginale, corelația între subexpresia miR-124 și fumat ar putea constitui un punct de plecare pentru studiile viitoare, care să analizeze mecanismul de acțiune dat de subexpresia miR-124 la pacienții fumători. Mecanismul de apariție a CUV în urma expunerii la factorii de risc ocupaționali ar putea fi explicat prin acțiunea biomoleculară dată de expresiile scăzute ale miR-145-3p și miR-145-5p. Speciile micro-ARN analizate nu se corelează cu prezența factorilor de risc genetici ce i-am putut identifica în populația studiată și nici cu istoricul de infecții de tract urinar.

Am analizat, în continuare, relațiile dintre parametrii care s-au dovedit a fi predictivi pentru supraviețuire în cadrul primului studiu al tezei și valorile ajustate ale expresiei speciilor

de micro-ARN selecționate în studiu. Valorile preoperatorii ale hemoglobinei, creatininei serice, ale Cyfra 21-1 serice, precum și numărul unităților MER transfuzate au fost incluse în analiză, iar rezultatele statistice sunt prezentate în *Tabelul 9*.

Tabelul 9 – Corelațiile dintre factorii predictivi pentru supraviețuire și valoarea ajustată a expresiei speciilor de micro-ARN studiate

Micro-ARN	Hemoglobina preoperatorie		Creatinina serică preoperatorie		Cyfra 21-1 seric preoperator		Numărul unităților MER transfuzate	
	r	p	r	p	r	p	r	p
miR-124	-0.004	0.9626	-0.181	0.0935	0.076	0.4729	0.017	0.8699
miR-126	-0.113	0.2833	-0.119	0.2591	0.031	0.7700	0.029	0.7808
miR-139	-0.075	0.4781	-0.152	0.1497	-0.088	0.4052	0.045	0.6709
miR-145-3p	0.005	0.9588	-0.233	0.0259	0.149	0.1571	-0.012	0.9099
miR-145-5p	-0.004	0.9684	-0.147	0.1615	0.127	0.2301	-0.024	0.8150
miR-152	-0.209	0.0461	-0.197	0.0609	0.042	0.6912	0.115	0.2773
miR-182	0.153	0.1464	0.074	0.4809	0.306	0.0030	-0.046	0.6645

Analiza arată o corelație statistică importantă ($p < 0.0461$), negativă, cu indice care arată o relație slabă (-0.209) între expresia miR-152 și valoarea preoperatorie a hemoglobinei. Dat fiind faptul că subexpresia miR-152 are rol în apariția și dezvoltarea CUV, normalizarea expresiei ajustate a miR-152 și creșterea valorii FC spre 1 ar putea declanșa un mecanism de angiogeneză și, consecutiv, o vascularizație mai bună a tumorii care să conducă la șanse mai mari de apariție a hematuriei cu anemie secundară. Rezultatele noastre ar putea constitui un pas important în elucidarea efectului pe care îl are miR-152 asupra mecanismului biomolecular de apariție a vaselor de neoformație la nivelul CUV.

Creatinina serică preoperatorie s-a asociat expresiei miR-145-3p, analiza statistică demonstrând o corelație negativă importantă ($p = 0.0259$), cu indice scăzut (-0.233). Corelații la limita semnificației statistice au fost obținute și între valorile creatininei serice și expresiile ajustate ale miR-124 ($p = 0.0935$) și ale miR-152 ($p = 0.0609$). Valorile crescute ale creatininei ar putea accentua subexpresiile miR-124, miR-145-3p și miR-152 și ar putea avea un rol oncogenic suplimentar pentru CUV.

Valoarea Cyfra 21-1 preoperatorie a fost puternic corelată ($p = 0.0030$) cu expresia normalizată a miR-182, această relație fiind pozitivă, cu indice de valoare medie (0.306).

Supraexpresia miR-182 la nivel tumoral ar putea stimula procesul de liză celulară ce duce la creșterea valorilor serice ale Cyfra 21-1. Numărul de unități MER administrate nu s-a corelat cu niciuna dintre speciile micro-ARN.

Relația dintre stadializarea TNM și expresia normalizată a profilului micro-ARN a fost evaluată, conform *Tabelului 10*. Corelația dintre stadializarea pN și expresia ajustată a profilului micro-ARN a fost făcută excluzând pacienții la care nu s-a practicat limfodisecție ilio-obturatorie. Astfel, analiza statistică a inclus doar 71 dintre pacienții studiați în cercetare.

Tabelul 10 – Corelațiile dintre stadializarea TNM și profilul microARN studiat

Micro-ARN	Stadiul pT		Stadiul pN		Stadiul M	
	r	p	r	p	r	p
miR-124	-0.190	0.0705	-0.040	0.7405	0.052	0.6204
miR-126	0.048	0.6478	0.251	0.0346	-0.026	0.8045
miR-139	-0.026	0.8007	0.178	0.1366	0.147	0.1642
miR-145-3p	-0.045	0.6678	0.179	0.1337	0.010	0.9193
miR-145-5p	-0.020	0.8459	0.215	0.0709	0.023	0.8220
miR-152	0.079	0.4519	0.313	0.0078	-0.005	0.9551
miR-182	0.041	0.6981	0.056	0.6424	0.104	0.3265

În ceea ce privește stadializarea pT și relația acesteia cu expresiile micro-ARN, analiza a arătat că există o corelație marginal nesemnificativă ($p = 0.0705$), negativă, cu indice cu valoare slabă (-0.190) între expresia ajustată a miR-124 și stadiul invaziei tumorale pT. Rezultatul obținut ne sugerează faptul că cu cât expresia miR-124 este mai mică, cu atât stadiul pT în care este surprins pacientul la momentul CR este mai avansat și poate constitui punctul de plecare pentru un nou studiu care să-și propună validarea expresiei miR-124 ca marker de prognostic pentru pacienții cu CUV.

Stadiul metastatic al pacienților, evaluat imagistic preoperator, nu a fost corelat cu niciuna dintre expresiile speciilor de micro-ARN analizate. Cele mai importante rezultate au fost obținute corelând stadializarea pN și profilul micro-ARN. În acest fel, am obținut rezultate semnificative din punct de vedere statistic pentru miR-126 ($p = 0.0346$), expresia ajustată a acestuia corelându-se pozitiv, cu indice slab (0.251) cu prezența adenopatiilor la pacienții cu CUV. MiR-152 a fost puternic corelat pozitiv (0.313) cu stadializarea pN a pacienților incluși în studiu, analiza arătând o puternică corelație statistică ($p = 0.0078$). O corelație pozitivă,

marginal nesemnificativă ($p = 0.0709$) și cu indice slab (0.215) a fost obținută în această analiză și pentru miR-145-5p. Deși subexpresiile miR-126, miR-145-5p și miR-152 au rol în oncogeneza CUV, valorile relativ crescute ale expresiei acestor specii micro-ARN ar putea determina apariția ganglionilor loco-regionali pozitivi. Rezultatele noastre ar putea constitui un prim pas în elucidarea mecanismului prin care celulele tumorale migrează de la nivelul tumorii primare vezicale, la nivelul ganglionilor loco-regionali.

Corelațiile dintre expresia ajustată a micro-ARN-urilor studiate și cele mai frecvente tipuri de diferențiere tumorală, respectiv tipurile de diferențiere tumorală care au fost rar întâlnite la pacienții pe care i-am inclus în cercetare au fost analizate conform *Tabelului 11* și *Tabelului 12*.

Tabel 11 – Corelațiile dintre profilul micro-ARN și tipurile de diferențiere tumorală cele mai des întâlnite la pacienții analizați

Micro-ARN	Convențional		Scuamos		Micropapilar		Comedo-carcinom		Sincițio-trofoblast	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
miR-124	0.065	0.5382	-0.045	0.6714	-0.001	0.9907	0.148	0.1605	-0.075	0.4782
miR-126	-0.145	0.1693	0.056	0.5977	0.022	0.8341	0.035	0.7390	0.012	0.9037
miR-139	-0.104	0.3223	0.019	0.8523	0.032	0.7622	-0.050	0.6340	0.060	0.5683
miR-145-3p	0.070	0.5039	-0.041	0.6981	0.034	0.7445	-0.047	0.6568	-0.034	0.7427
miR-145-5p	0.065	0.5382	-0.098	0.3509	0.048	0.6498	-0.040	0.7033	-0.001	0.9862
miR-152	0.066	0.5329	0.139	0.1870	-0.091	0.3883	0.003	0.9746	0.007	0.9449
miR-182	0.016	0.8778	0.007	0.9423	-0.055	0.6003	-0.131	0.2140	0.208	0.0495

Analiza prezentată a arătat o corelație semnificativă statistic ($p = 0.0495$), pozitivă, cu indice slab (0.208) între expresia ajustată a miR-182 și diferențierea sincițiotrofoblastică a CUV, dar și o corelație importantă ($p = 0.0316$), negativă, cu indice slab (-0.225) între expresia ajustată a miR-182 și prezența diferențierii tumorale de tip celule în cuiburi („nested”). Aceste observații arată că expresia tumorală a miR-182 ar putea fi activ implicată în apariția acestor variante histopatologice a CUV.

Tabel 12 – Corelațiile dintre profilul micro-ARN și tipurile de diferențiere tumorală rar întâlnite la pacienții analizați

Micro-ARN	Celule în cuiburi „nested”		Sarcomatoid		Plasmocitoid		Nediferențiat	
	r	p	r	p	r	p	r	p
miR-124	-0.082	0.4355	0.048	0.6503	-0.136	0.1971	-0.060	0.5708
miR-126	0.001	0.9989	-0.116	0.2719	-0.132	0.2108	0.180	0.0867
miR-139	-0.019	0.8509	-0.112	0.2889	-0.175	0.0919	0.160	0.1285
miR-145-3p	-0.057	0.5910	-0.160	0.1285	-0.168	0.1102	0.140	0.1842
miR-145-5p	-0.028	0.7883	-0.148	0.1601	-0.160	0.1285	0.152	0.1490
miR-152	-0.014	0.8932	-0.060	0.5708	-0.144	0.1718	0.148	0.1601
miR-182	-0.225	0.0316	-0.104	0.3250	-0.156	0.1384	0.164	0.1191

Corelații marginal ne semnificative (p cuprins între 0.05 și 0.10) au fost obținute între tipul de diferențiere plasmocitoidă și expresia miR-139 (p = 0.0919), cu indice slab, negativ (-0.175), dar și între CUV nediferențiat și expresia miR-126 (p = 0.0867), cu indice slab, pozitiv (0.180). Mecanismele prin care se produce diferențierea tumorală a CUV și se dezvoltă diferitele variante histopatologice ale sale sunt incomplet elucidate. Observația noastră poate constitui un prim pas în elucidarea mecanismelor de acțiune ale miR-126, miR-139 și miR-182.

Corelațiile dintre caracteristicile histo-patologice ale tumorii și expresia normalizată a profilului micro-ARN au fost analizate conform Tabelului 13.

Tabelul 13 – Corelațiile dintre profilul micro-ARN și caracteristicile histo-patologice tumorale

Micro-ARN	Gradul de diferențiere		LVI		PNI	
	r	p	r	p	r	p
miR-124	-0.258	0.0133	-0.096	0.3638	-0.070	0.5086
miR-126	-0.066	0.5312	-0.092	0.3812	-0.082	0.4349
miR-139	-0.171	0.1043	-0.174	0.0979	-0.099	0.3468
miR-145-3p	-0.150	0.1539	-0.074	0.4834	-0.058	0.5801
miR-145-5p	-0.079	0.4522	0.030	0.7708	0.032	0.7624
miR-152	-0.156	0.1382	-0.146	0.1667	-0.060	0.5665
miR-182	0.087	0.4113	-0.015	0.8842	-0.119	0.2604

Analiza statistică a arătat o corelație importantă, negativă, cu indice slab (-0.258), între expresia miR-124 și gradul de diferențiere tumorală al CUV ($p = 0,0133$). Pacienții care au avut CUV HG (high-grade) pe piesa de CR au avut un nivel mai mic al expresiei normalizate a miR-124, prin comparație cu pacienții care au avut ca rezultat histo-patologic CUV LG (low-grade). Acest rezultat susține ipoteza conform căreia valorile scăzute ale expresiei miR-124 sunt asociate tumorilor agresive, cu grad înalt de malignitate, expresia miR-124 fiind asociată și cu stadiul patologic T al tumorii.

Un rezultat marginal ne semnificativ ($p = 0.0979$), cu indice slab, negativ (-0.174) a fost obținut pentru corelația dintre miR-139 și prezența LVI pe piesa de CR. Astfel, acțiunea dată de subexpresia miR-139 ar putea duce la apariția invaziei limfo-vasculare la nivel tumoral.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

CUV este al doilea cel mai frecvent tip de neoplasm ce afectează aparatul urinar, cu rate de incidență, prevalență crescute. În practica urologică, medicii se confruntă de multe ori cu situații ce le îngreunează luarea unor decizii în contextul lipsei unor biomarkeri utili în diagnosticul și monitorizarea CUV și a unor predictorii pentru supraviețuire sau recidivă. În era medicinei moderne în care există o importantă tendință de a personaliza tratamentul pentru fiecare bolnav în parte, medicii trebuie să folosească cât mai mulți parametri preoperatorii pentru a lua o decizie favorabilă pacientului. Mai mult, un procent însemnat dintre pacienți dorește să cunoască, în detaliu, prognosticul pe care îl au și eventualii parametri nefavorabili ce caracterizează afecțiunea lor. Preocuparea tot mai mare pe care a arătat-o medicina modernă în privința studiului genomic al tuturor neoplasmelor, în general, și în privința CUV, în special, va conduce, cu siguranță, la abordarea personalizată a fiecărui pacient, în funcție de expresia genică a tumorii sale.

Datorită obiectivelor propuse și a patologiei pe care am studiat-o, această cercetare va avea un impact important având în vedere că a analizat supraviețuirea pacienților cu CUV tratați prin CR și a reușit să identifice numeroși factori predictivi pentru supraviețuirea postoperatorie. Unul dintre factorii care s-au dovedit a fi predictivi pentru supraviețuirea pacienților cu CR, Cyfra 21-1 seric, a fost pentru prima dată studiat în această cercetare, ca factor de prognostic exclusiv pentru pacienții cu CR. O altă contribuție personală este analiza profilului micro-ARN.

Deși mecanismul de acțiune al speciilor de micro-ARN studiate au fost descrise în literatură, rezultatele privind corelațiile noi descoperite în această cercetare, dintre parametrii clinico-biologici și histo-patologici și expresiile ajustate ale speciilor de micro-ARN, sunt extrem de importante și au rolul de a stabili obiectivele viitoarelor cercetări din domeniu.

Cel mai important beneficiu al lucrării de cercetare este reprezentat de analiza simultană a unui panel de biomarkeri serici și tisulari, la același pacient, care poate ajuta medicii în luarea deciziilor clinice privind predicția stadiului patologic final și a supraviețuirii postoperatorii, acesta fiind, totodată, cel mai important avantaj oferit de studiul nostru. Alte avantaje oferite de teza de doctorat sunt caracterul prospectiv al studiului, analiza influenței parametrilor analizați asupra supraviețuirii pacienților, evaluarea capacității Cyfra 21-1 serice de a fi un important predictor pentru supraviețuire, corelațiile importante dintre valorile Cyfra 21-1 și parametrii histo-patologici, includerea în analiza profilului micro-ARN a 7 specii diferite și, nu în ultimul rând, corelațiile importante obținute dintre expresiile speciilor micro-ARN și parametrii predictivi pentru decesul pacienților în timpul urmăririi postoperatorii.

Considerăm că cercetarea profilului micro-ARN trebuie să continue cu analiza expresiei speciilor selectate la pacienții diagnosticați cu CUV-NMI, putând, astfel, identifica bolnavii care au tumori cu caracteristici genetice și biomoleculare ce îi încadrează într-o clasă cu risc crescut de progresie a bolii către stadiile MI. Acest lucru ar putea duce la efectuarea CR înainte ca pacienții să ajungă în stadiile local avansate sau cu ganglioni loco-regionali pozitivi și, consecutiv, la creșterea ratelor de supraviețuire postoperatorie ale pacienților cu CR pentru CUV. Dezavantajele studiului nostru sunt reprezentate de numărul relativ mic de pacienți analizați, complianța scăzută a pacienților la determinarea valorilor serice postoperatorii ale Cyfra 21-1 și perioada relativ scurtă de urmărire a pacienților incluși în cercetare.

Realizarea acestei lucrări de cercetare și analiza statistică a rezultatelor obținute în cadrul celor două studii privind analiza factorilor predictivi pentru supraviețuirea pacienților cu CUV tratați prin CR și privind analiza profilului micro-ARN a acestor pacienți, ne-a permis emiterea unor concluzii importante:

1. Rata de mortalitate a pacienților cu CR a fost de 40.65%, în decursul unei perioade de urmărire medie de 26.5 luni (minim 17 luni, maxim 38 luni)

2. Vârsta nu a fost factor predictiv pentru supraviețuirea pacienților cu CR. Totuși, pacienții care au decedat din cauză oncologică au fost mai tineri decât cei care au decedat din alte cauze
3. Sexul masculin s-a asociat cu scăderea supraviețuirii postoperatorii, rata de hazard fiind de 5.17 ori mai mare pentru bărbați față de femei
4. Scorul CCI ≥ 1 s-a asociat cu o creștere cu 34% a ratei de hazard
5. Expunerea la factorii de risc ocupaționali s-a asociat cu scăderea ratei de supraviețuire, riscul de deces fiind de 2.66 ori mai mare
6. Stadializarea imagistică preoperatorie a fost predictivă pentru supraviețuire. Stadiul clinic $\geq cT3$ a fost asociat cu un risc de deces de 3.41 ori mai mare, iar stadiul clinic $\geq cN2$ cu o rată de hazard de 2.15 ori mai mare.
7. Prezența preoperatorie a determinărilor secundare a crescut de 2.66 ori riscul de deces, fiind un important factor de prognostic independent identificat prin analiza multivariată
8. Stadializarea patologică, stabilită în urma analizării histologice a piesei de CR, a fost un factor predictiv pentru supraviețuire. Stadiul patologic $\geq pT3$ a dus la creșterea ratei de hazard de 5.30 ori, în timp ce stadiul patologic $\geq pN2$ a crescut riscul de deces de 3.13 ori
9. Prezența LVI sau PNI pe piesa de CR nu a influențat supraviețuirea pacienților. De asemenea, gradul înalt de diferențiere tumorală nu s-a asociat cu scăderea supraviețuirii pacienților
10. Prezența diferențierii sincițiotrofoblastice pe piesa de CR a dus la creșterea ratei de hazard de 7.12 ori, fiind un important factor de prognostic independent identificat prin analiza multivariată
11. Valoarea hemoglobinei preoperatorii a fost un predictor independent pentru supraviețuirea pacienților după CR, rata de hazard scăzând cu 22% pentru o creștere cu 0.1 g/ml a hemoglobinei. Analiza curbei ROC a permis identificarea unei valori cut-off de 13.15 g/dl, capabile să identifice corect decesul cu o sensibilitate de 73% și o specificitate de 72%
12. Transfuzia a cel puțin o unitate MER în timpul internării a crescut rata de hazard de 5.91 ori
13. Valoarea preoperatorie a creatininei serice a fost predictivă pentru supraviețuire, o creștere cu 0.1 mg/dl a valorii sale fiind asociată cu o creștere cu 34% a ratei de hazard.

Analiza curbei ROC a permis identificarea unei valori cut-off de 1.58 mg/dl, capabile să identifice corect decesul cu o sensibilitate de 88% și o specificitate de 43%

14. Valoarea preoperatorie a Cyfra 21-1 serice a fost predictivă pentru supraviețuire, fiind un factor de prognostic independent identificat prin analiza multivariată. Analiza curbei ROC a permis identificarea unei valori cut-off pentru Cyfra 21-1 de 5.27 ng/dl, capabile să identifice corect decesul cu o sensibilitate de 48% și o specificitate de 92%. De asemenea, valorile preoperatorii ale Cyfra 21-1 s-au corelat cu stadiile pT și pN

15. Cyfra 21-1 serică măsurată postoperatoriu la 3 și 6 luni a fost predictivă pentru supraviețuirea pacienților

16. Analiza Nelson-Aalen a identificat ca predictorii prezența preoperatorie a metastazelor și valoarea preoperatorie a Cyfra 21-1, aceștia păstrându-și în timp funcția de hazard

17. Analiza expresiei ajustate a profilului micro-ARN a arătat că doar miR-182 este supraexprimat la nivel tumoral. Restul speciilor analizate (miR-124, miR-126, miR-139, miR-145-3p, miR-145-5 si miR-152) au fost subexprimate la nivelul țesuturilor tumorale recoltate

18. Niciuna dintre speciile micro-ARN analizate nu a fost predictivă pentru supraviețuirea pacienților

19. Subexpresia miR-124 a fost corelată marginal, negativ cu identificarea fumatului, ca factor de risc

20. Subexpresia speciilor miR-145-3p și miR-145-5p a fost corelată marginal, negativ cu expunerea la factorii de risc ocupaționali

21. Valorile hemoglobinei preoperatorii au fost corelate slab, negativ, semnificativ statistic cu expresiile normalizate ale miR-152

22. Valorile preoperatorii ale creatininei serice sunt puternic corelate negativ cu expresia ajustată a miR-145-3p și corelate marginal, negativ cu expresiile normalizate ale miR-124 și miR-152

23. Valorile preoperatorii ale Cyfra 21-1 serice au fost corelate pozitiv, semnificativ statistic, cu expresia ajustată a miR-182

24. Stadiul pT s-a corelat marginal din punct de vedere statistic, negativ cu subexpresia miR-124

25. Stadiul pN a fost corelat semnificativ statistic, pozitiv, cu expresia ajustată a miR-126 și a miR-152 și marginal, pozitiv, cu expresia ajustată a miR-145-5p
26. Stadiul metastatic nu a fost corelat cu niciuna dintre expresiile speciilor micro-ARN analizate
27. Prezența diferențierii sincițiotrofoblastice a fost corelată pozitiv, semnificativ statistic, cu expresia miR-182
28. Prezența variantei CUV cu celule în cuiburi („nested”) a fost corelată negativ, semnificativ statistic, cu expresia miR-182
29. Diferențierea plasmocitoidă s-a asociat marginal, negativ, cu subexpresia miR-139
30. Prezența CUV nediferențiat a fost asociată marginal, pozitiv, cu expresia miR-126
31. Gradul de diferențiere tumorală a fost corelat negativ, semnificativ statistic, cu expresia ajustată a miR-124
32. Prezența LVI a fost corelată marginal, negativ, cu expresia miR-139

Bibliografie selectivă

1. Huang YL, Chen J, Yan W, Zang D, Qin Q, Deng AM. Diagnostic accuracy of cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21–1) for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol.* 2015;36(5):3137–45.
2. Nisman B, Barak V, Shapiro A, Golijanin D, Peretz T, Pode D. Evaluation of urine CYFRA 21-1 for the detection of primary and recurrent bladder carcinoma. *Cancer.* 2002;94(11):2914–22.
3. Fernandez-Gomez J, Rodríguez-Martínez JJ, Barmadah SE, García Rodríguez J, Allende DM, Jalon A, et al. Urinary CYFRA 21.1 Is Not a Useful Marker for the Detection of Recurrences in the Follow-Up of Superficial Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2007;51(5):1267–74.
4. Fatela-Cantillo D, Fernández-Suárez A, Menéndez V, Galán JA, Filella X. Low utility of CYFRA 21-1 serum levels for diagnosis and follow-up in bladder cancer patients. *J Clin Lab Anal.* 2005;19(4):167–71.
5. Washino S, Hirai M, Matsuzaki A, Kobayashi Y. Clinical usefulness of CEA, CA19-9,

- and CYFRA 21-1 as tumor markers for urothelial bladder carcinoma. *Urol Int*. 2011;87(4):420–8.
6. Andreadis C, Touloupidis S, Galaktidou G, Kortsaris AH, Boutis A, Mouratidou D. Serum CYFRA, 21-1 in patients with invasive bladder cancer and its relevance as a tumor marker during chemotherapy. *J Urol*. 2005;174(5):1771–6.
 7. Kuang LI, Song WJ, Qing HM, Yan S, Song FL. CYFRA21-1 levels could be a biomarker for bladder cancer: A meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):3921–31.
 8. Petcu C, Baston C, Angelescu E, Iacob MM, Constantinescu I, Sinescu I. The Role of MiR-124 in Bladder Cancer – A Review of the Literature. 2021;29(1):9–18.
 9. Hofbauer SL, de Martino M, Lucca I, Haitel A, Susani M, Shariat SF, et al. A urinary microRNA (miR) signature for diagnosis of bladder cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig [Internet]*. 2018;36(12):531.e1-531.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.09.006>
 10. Shindo T, Shimizu T, Nojima M, Niinuma T, Maruyama R, Kitajima H, et al. Evaluation of Urinary DNA Methylation as a Marker for Recurrent Bladder Cancer: A 2-Center Prospective Study. *Urology [Internet]*. 2018;113:71–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.11.025>
 11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 12. Gschwend JE, Heck MM, Lehmann J, Rübber H, Albers P, Wolff JM, et al. Extended Versus Limited Lymph Node Dissection in Bladder Cancer Patients Undergoing Radical Cystectomy: Survival Results from a Prospective, Randomized Trial(Figure presented.). *Eur Urol*. 2019;75(4):604–11.
 13. Venkatramani V, Reis IM, Castle EP, Gonzalgo ML, Woods ME, Svatek RS, et al. Predictors of Recurrence, and Progression-Free and Overall Survival following Open versus Robotic Radical Cystectomy: Analysis from the RAZOR Trial with a 3-Year Followup. *J Urol*. 2020;203(3):522–9.
 14. Wissing MD, Santos F, Zakaria AS, O’Flaherty A, Tanguay S, Kassouf W, et al. Short- and long-term survival has improved after radical cystectomy for bladder cancer in Québec during the years 2000-2015. *J Surg Oncol*. 2019;119(8):1135–44.
 15. Lin HY, Ye H, Kernan KM, Hafron JM, Krauss DJ. National Cancer Database

- Comparison of Radical Cystectomy vs Chemoradiotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: Implications of Using Clinical vs Pathologic Staging. *Cancer Med.* 2018;7(11):5370–81.
16. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Globocan 2018 [Internet]. Globocan. 2018. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
 17. Waldhoer T, Berger I, Haidinger G, Zielonke N, Madersbacher S. Sex differences of \geq pT1 bladder cancer survival in Austria: A descriptive, long-term, nation-wide analysis based on 27,773 patients. *Urol Int.* 2015;94(4):383–9.
 18. Otto W, May M, Fritsche HM, Dragun D, Aziz A, Gierth M, et al. Analysis of sex differences in cancer-specific survival and perioperative mortality following radical cystectomy: Results of a large german multicenter study of nearly 2500 patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Gend Med [Internet].* 2012;9(6):481–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.genm.2012.11.001>
 19. Pan J, Xue W, Sha J, Yang H, Xu F, Xuan H, et al. Incidental prostate cancer at the time of cystectomy: The incidence and clinicopathological features in chinese patients. *PLoS One.* 2014;9(4).
 20. Lopez-Beltran A, Henriques V, Montironi R, Cimadamore A, Raspollini MR, Cheng L. Variants and new entities of bladder cancer. *Histopathology.* 2019;74(1):77–96.
 21. Mathieu R, Lucca I, Rouprêt M, Briganti A, Shariat SF. The prognostic role of lymphovascular invasion in urothelial carcinoma of the bladder. *Nat Rev Urol [Internet].* 2016;13(8):471–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2016.126>
 22. Schubert T, Todenhöfer T, Mischinger J, Schwentner C, Renninger M, Stenzl A, et al. The prognostic role of pre-cystectomy hemoglobin levels in patients with invasive bladder cancer. *World J Urol.* 2016;34(6):829–34.
 23. Buchner A, Grimm T, Schneevoigt BS, Wittmann G, Kretschmer A, Jokisch F, et al. Dramatic impact of blood transfusion on cancer-specific survival after radical cystectomy irrespective of tumor stage. *Scand J Urol [Internet].* 2017;51(2):130–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21681805.2017.1295399>
 24. Matsumoto A, Nakagawa T, Kanatani A, Ikeda M, Kawai T, Miyakawa J, et al. Preoperative chronic kidney disease is predictive of oncological outcome of radical

cystectomy for bladder cancer. World J Urol [Internet]. 2018;36(2):249–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00345-017-2141-2>

Lista de lucrări științifice publicate

Articole publicate în reviste de specialitate

1. Iacob MM, **Petcu C**, Vassu-Dimov T, Constantinescu I. MicroRNAs Expression Profiles in Romanian Patients with Urinary Bladder Cancer-Preliminary Results. Immunogenetics: Open Access, Sep 2018, 3:119.
<https://www.longdom.org/open-access/micrnas-expression-profiles-in-romanian-patients-with-urinary-bladder-cancerpreliminary-results.pdf>
2. Constantinescu I, **Petcu C**, Iacob MM. Are MicroRNAs Reliable Prognostic Biomarkers in Liver Hepatocellular Carcinoma Development? Immunotherapy: Open Access, Nov 2018, 4:151. ISSN:2471-9552 doi:10.4172/2471-9552.1000151
<https://www.longdom.org/open-access/are-micrnas-reliable-prognostic-biomarkers-in-liver-hepatocellular-carcinoma-development.pdf>
3. **Petcu C**, Baston C, Margaritis S, Manea IF, Preda AT, Angelescu E, Sinescu I. Risk Factors Associated with Bladder Cancer – a Retrospective Study of 391 Radical Cystectomy Patients. Revista Română de Urologie, 2019, 18(4):5-8. ISSN: 1223-0650 (CNCSIS-B+486)
<http://revista-urologia.ro/wp-content/uploads/2020/09/Risk-Factors-Associated-with-Bladder-Cancer-%E2%80%93-a-Retrospective-Study-of-391-Radical-Cystectomy-Patients.pdf>
4. Iacob MM, **Petcu C**, Vassu-Dimov T, Cucu N, Constantinescu I. Are Changes in MicroRNAs Expression A Relevant Biomarker for Urinary Bladder Cancer Prognosis? Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 2020, 24(4):18429-36. ISSN: 2574-1241. doi: 10.26717/BJSTR.2020.24.004084
<https://biomedres.us/pdfs/BJSTR.MS.ID.004084.pdf>
5. **Petcu C**, Baston C, Angelescu E, Iacob MM, Constantinescu I, Sinescu I. The Role of MiR-124 in Bladder Cancer – A Review of the Literature. Revista Română de Medicină de Laborator, 2021, 29(1):9-18. ISSN online: 2284-5623, ISSN-L: 1841-6624, Impact factor (2019): 0.945, doi:10.2478/rmlm-2021-0001
http://www.rml.ro/articole/2021/2021_1_1.pdf

Lucrări prezentate la manifestări științifice organizate de asociații profesionale naționale și internaționale

1. Iacob MM, Moise A, **Petcu C**, Baston C, Oprea A, Nedelcu DF, Constantinescu I. The clinical relevance of microRNAs in diagnosis and prognosis of urinary bladder tumors post kidney transplantation. The 47th Annual Immunology Conference, Romanian Society for Immunology. 4-6 Oct 2017, București, România.
2. Iacob MM, **Petcu C**, Constantinescu I, Moise A, Baston C, Cucu N, Vassu-Dimov T, Sinescu I. MicroRNAs – new biomarkers in the management of urinary bladder cancer. Congress of the University of Medicine and Pharmacy “Carol Davila”, 7-9 June 2018, București, România. Rezumat publicat în revista MÆDICA - a Journal of Clinical Medicine, 2018, vol 13, supplement, pag 33, ISSN: 2501-6903.
3. **Petcu C**, Baston C, Manea IF, Dudu C, Teodorescu D, Baicoianu IF, Sinescu I. Comparison between intraoperative tumor extension and imaging staging in patients undergoing radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. EAU 18th Central European Meeting in conjunction with the 34th national congress of the Romanian Association of Urology, 11-12 October 2018, Cluj-Napoca, România. Rezumat publicat în revista European Urology Supplements 2018, 17(12):e2701, ISSN: 1569-9056.
doi: [https://doi.org/10.1016/S1569-9056\(18\)33540-1](https://doi.org/10.1016/S1569-9056(18)33540-1)
4. Iacob MM, Vassu-Dimov T, Cucu N, **Petcu C**, Baston C, Constantinescu I, Sinescu I, MiRNAs expression reflects pathological changes in patients with urinary bladder cancers. Congress of the University of Medicine and Pharmacy “Carol Davila”, 10-12 October 2019, București, România. Rezumat publicat în revista MÆDICA - a Journal of Clinical Medicine, 2019, vol 14, supplement, pag 18, ISSN: 2501-6903.