VICTOR SROUGI

Análise de um painel de biomarcadores urinários para identificar e prever recidivas de carcinoma urotelial superficial de bexiga.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. William Carlos Nahas

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Srougi, Victor

Análise de um painel de biomarcadores urinários
para identificar e prever recidivas de carcinoma
urotelial superficial de bexiga / Victor Srougi. --
São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: William Carlos Nahas.

Descritores: 1.Neoplasias urológicas 2.Neoplasias
da bexiga urinária 3.Biomarcadores 4.Diagnóstico
5.Recidiva 6.Inibidor 1 de ativador de
plasminogênio 7.Proteína desglucase DJ-1
8.Apolipoproteína A-1 9.Metaloproteinase 9 da matriz
10.Interleucina-8.

USP/FM/DBD-504/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Miguel e Iara, que me
protegeram sob suas asas e com elas me
ensinaram a voar. Meus heróis. À Ana Carolina,
minha mulher, que me encanta, suporta minha
ausência e com sua doçura alegra minha
existência*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. William Carlos Nahas, meu orientador, que dedicou seu tempo para iluminar meu caminho.

À Prof. Kátia Ramos Leite e à Prof. Sabrina Thalita Reis, líderes, inspiradoras, cuja grandeza enaltece as mulheres.

À Nayara Viana, Vanessa Guimarães e Ruan Pimenta, que tornaram esta tese possível, exemplos de dedicação e fraternidade.

À Elisa Cruz, autora anônima de inúmeras teses, que se aplica diligentemente aos alunos da urologia.

Ao Thomaz, Karin, Pedro E Valentina, alicerces da minha vida.

À FAPESP pelo apoio financeiro (2016/07917-5).

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xiii
Resumo	xiv
Summary	xv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Câncer de bexiga	17
1.2 Seguimento clínico após o tratamento das neoplasias vesicais superficiais	18
1.3 Biomarcadores urinários	19
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos primários	29
2.2 Objetivo secundário	29
3. MÉTODOS	30
3.1 Tipo de estudo	31
3.2 Pacientes, local e época	31
3.3 Desenho do estudo e desfechos	32
3.4 Ética	34
3.5 Cálculo da amostra	34
3.6 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Associação dos biomarcadores e o diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga.	42
4.2 Associação dos biomarcadores e a previsão de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga durante o seguimento (valor antecipatório).	45
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	57
7. ANEXO	59
Anexo A - Tabela para cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do painel dos biomarcadores para o diagnóstico de recidiva.	60
Anexo B - Tabela para cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do painel dos biomarcadores para prever recidiva durante o seguimento.	60
8. REFERÊNCIAS	61

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

AKT – Serina-Treonina Quinase;

ApoA - Apolipoproteína

ATF3 - *Activating Transcription Factor 3*;

BTA-Stat – *Bladder Tumor Antigen Stat*

BCG – Bacilo de Calmett-Guerin;

DJ-1 – *Nucleic Acid Deglycase*

DP – Desvio Padrão;

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico;

ERK - *Extracellular-Signal-Regulated Kinase*;

FISH - Hibridização *in situ* Fluorescente;

HDL - *High Density Lipoprotein*

HIF-1 – Fator 1-alfa induzível por hipóxia

IC – Intervalo de Confiança;

ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo;

IFN-G – Interferon Gama;

IL-8 – Interleucina 8;

MEC – Modelação da Matriz Extracelular;

MEK – *Mitogen-activated Protein Kinase*

miR – microRNA;

MMP9 – Metaloproteinase de Matriz 9;

mTOR – Gene Alvo da Rapamicina de Mamíferos;

NMP22 - Proteína de Matriz Nuclear 22;

P53 - proteína citoplasmática, de massa molecular 53 kDa;

PAI-1 - Plasminogênio

PARK-7 – Proteína de Doença de Parkinson;

PIK3 – Fosfatidilinositol 3 quinase;

PTEN – Gene Homólogo da Fosfatase e Tensina;

RaF - *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

RR – Risco Relativo;

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta;

UBC – *Urinary Bladder Cancer Test*

VPP – Valor Preditivo Positivo;

VPN – Valor Preditivo Negativo;

μ L – Microlitros;

nm - Nanômetros;

< - menor;

> - Maior;

$\leq$ - Menor ou igual;

$\geq$ - Maior ou igual;

$\pm$ - Mais ou Menos.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características clínicas da população.	39
Tabela 2. Relação do nível dos biomarcadores urinários e os dados clínicos dos pacientes	40
Tabela 3. Relação do nível dos biomarcadores urinários e os dados da RTU de bexiga antes da coleta de urina (N 134)	41
Tabela 4. Razão de risco de diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga quando os biomarcadores estão a cima do valor de corte.	45
Tabela 5. Razão de risco para predição de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga quando os biomarcadores estão a cima do valor de corte.....	46
Tabela 6. Relação do nível dos biomarcadores urinários e os dados da aplicação de BCG.....	48

Lista de Figuras

Figura 1. Papel das proteínas analisadas na oncogênese. Gráficos fornecidos pelo Cancer Hallmarks Analytics Tool (http://chat.lionproject.net/).	27
Figura 2. População do estudo.....	32
Figura 3. Nível dos biomarcadores entre pacientes sem e com diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga (N 135 vs. 16).	43
Figura 4. Curvas ROC dos níveis dos biomarcadores urinários para o diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga (N =152): (A) PAI-1 (B) DJ-1, (C) ApoA-1, (D) MMP-9 e (E) IL-8.....	44
Figura 5. Curva de sobrevida livre de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga. Tempo médio para recidiva tumoral no grupo controle e no grupo com PAI-1 e IL-8 alteradas de 53,9 meses e 39,1 meses, respectivamente (teste Long Rank).	47
Figura 6. Gráficos de dispersão e fator de correlação de Pearson da correlação entre o nível dos biomarcadores e o intervalo entre a última aplicação de BCG e a coleta de urina: (A) PAI-1, (B) DJ-1, (C) ApoA-1, (D) MMP-9 e (E) IL-8.....	49

Resumo

Srougi V. Análise de um painel de biomarcadores urinários para identificar e prever recidivas de carcinoma urotelial superficial de bexiga [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução: O seguimento de pacientes com câncer de bexiga superficial apresenta embargos financeiros e psicológicos ao paciente, devido à realização frequente de exames invasivos. Com fim de substituir ou diminuir os exames invasivos, busca-se biomarcadores urinários acurados, que permitam diagnosticar a recidiva tumoral e estratificar pacientes com maior risco de recidiva futura. O objetivo deste estudo é avaliar se expressão na urina de PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8 permite identificar e antecipar a recidiva de câncer de bexiga. **Método:** A expressão da PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8 foi mensurada por ELISA na urina de 152 pacientes tratados previamente de carcinoma urotelial superficial de bexiga e em seguimento. Os níveis das proteínas foram comparados entre pacientes com e sem recidiva de câncer de bexiga (1) no momento da coleta de urina e (2) durante o seguimento. A ocorrência de recidiva tumoral foi confirmada por análise histopatológica da biópsia de lesões suspeitas, investigadas quando havia alterações na cistoscopia, ultrassom ou citologia oncológica. Pacientes com recidiva diagnosticada no momento da coleta de urina foram excluídos da análise para avaliar o papel antecipatório das cinco proteínas. Foi avaliado se o uso prévio de BCG intra-vesical exercia influência no nível das cinco proteínas estudadas. **Resultados:** Entre os pacientes avaliados, 16 (10,5%) apresentaram recidiva de carcinoma urotelial no momento da coleta de urina e 21 (15,4%) apresentaram recidiva de carcinoma urotelial durante o seguimento. O seguimento mediano foi de 47 meses (interquartil de 39 e 50 meses). Um painel para o diagnóstico de recidiva tumoral incluindo três biomarcadores (ApoA-1, MMP-9 e IL-8) apresentou razão de risco de 12,9 (IC 95% =3,5-47,4) e um painel para prever pacientes que desenvolverão recidiva durante o seguimento incluindo dois biomarcadores (PAI-1 e IL-8) apresentou razão de risco de 4,1 (IC 95% =1,4-11,4). Os resultados dos painéis não foram influenciados pelo uso prévio de BCG intra-vesical. **Conclusão:** Os painéis apresentados permitem identificar pacientes com recidiva de carcinoma urotelial de bexiga e prever quais pacientes terão maior risco de desenvolver recidiva no futuro. O uso prévio de BCG intra-vesical não alterou a expressão dos biomarcadores.

Descritores: neoplasias urológicas; neoplasias da bexiga urinária; biomarcadores; diagnóstico; recidiva; inibidor 1 de ativador de plasminogênio; proteína desglicase DJ-1; apolipoproteína A-1; metaloproteinase 9 da matriz; interleucina-8.

Summary

Srougi V. Analysis of panel urinary biomarkers to identify and predict recurrence of superficial bladder urothelial carcinoma [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Purpose: To evaluate if the urinary levels of PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 and IL-8 can identify and predict tumor recurrence in patients on follow-up of superficial bladder cancer. **Methods:** We prospectively analyzed the urine of 152 patients previously treated of superficial bladder cancer on follow-up regimen. Five biomarkers (PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 and IL-8) were assessed by ELISA and compared among patients with and without bladder cancer recurrence (1) in the moment of urine collection and (2) during follow-up. Tumor recurrence was evaluated with cystoscopy, ultrasound and urine oncotic cytology and confirmed by pathological analysis. Patients with recurrence at urine collection were excluded from prediction analysis. A correlation between the level of the biomarkers and previous use of intravesical BCG was investigated. **Results:** Median follow-up was 47 months (IQR =39-50 months). Among patients included, 16 (10,5%; N =152) and 21 (15,4%; N =136) had bladder cancer recurrence diagnosed in the moment of urine collection and during follow-up, respectively. The panel to diagnose recurrence including 3 biomarkers (ApoA-1, MMP-9 and IL-8) presented OR =12,9 (CI =3,5-47,4), while the panel to predict patients who will have a recurrence during follow-up including 2 biomarkers (PAI-1 and IL-8) presented OR =4,1 (CI =1,4-11,4). Previous use of intra-vesical BCG didn't influence urine biomarkers expression. **Conclusions:** The 3-biomarker panel can be used to identify patients with bladder cancer recurrence. The 2-biomarker panel can be used to predict patients at greater risk of bladder cancer recurrence during follow-up. Both are reliable in patients with previous use of intravesical BCG.

Descriptors: urologic neoplasms; urinary bladder neoplasm; biomarkers; diagnosis; recurrence; plasminogen activator inhibitor 1; protein deglycase DJ-1; apolipoprotein A-1; matrix metalloproteinase 9; interleukine-8.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de bexiga

O câncer de bexiga é a quarta neoplasia com maior incidência em homens e a oitava em mortalidade nos Estados Unidos da América ⁽¹⁾. No Brasil é mais prevalente nas regiões desenvolvidas, estimando-se que cerca de 6.690 homens e 2.790 mulheres sejam diagnosticados com esta doença em 2018 ⁽²⁾. A faixa etária típica de manifestação deste tumor está entre a sexta e sétima década de vida e acredita-se que 50% dos casos estejam associados ao tabagismo, principal fator de risco ^(3,4). Em fumantes ativos e ex-fumantes o risco de desenvolver neoplasia vesical é de respectivamente 4,04 e 2,03 vezes maior que o da população geral ⁽⁵⁾. Outros fatores de risco conhecidos incluem exposição a aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ingestão de água contaminada com arsênico, radioterapia pélvica e uso crônico de medicamentos específicos (fenacetina, ciclofosfamida e chlornafazina) ⁽⁶⁾.

O câncer de bexiga acomete quatro vezes mais pacientes do sexo masculino do que feminino ⁽⁶⁾. Apesar disto, as mulheres apresentam formas mais graves desse tumor, o que confere pior prognóstico a este gênero ⁽⁷⁾. Entre os diferentes grupos étnicos, os brancos têm risco duas vezes maior de desenvolverem neoplasia vesical do que os afrodescendentes ⁽⁶⁾.

Cerca de 95% dos casos de câncer de bexiga são representados por carcinomas uroteliais ⁽³⁾. Adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e tumores mesenquimais são raros e não serão analisados nesse estudo.

No momento do diagnóstico, o carcinoma urotelial pode se apresentar de quatro formas: 1) Doença localizada superficial (restrita a mucosa e lâmina própria); 2) Doença localizada invasiva (infiltração da camada muscular); 3) Doença localmente avançada

(quando ultrapassa a camada muscular da bexiga e atinge tecidos ou estruturas adjacentes); 4) Doença metastática. Cerca de 70% dos tumores recém descobertos são localizados e superficiais, os quais apesar de se associarem a baixas taxas de mortalidade, apresentam 70% de chance de recidiva e até 30% de chance de progressão para doença invasiva nos 5 anos seguintes ao diagnóstico ⁽³⁾. Nos tumores que ultrapassam as camadas profundas da bexiga a mortalidade em cinco anos é de 30% ⁽⁸⁾. Nos casos de doença metastática a taxa de mortalidade supera 80% ⁽³⁾.

1.2 Seguimento clínico após o tratamento das neoplasias vesicais superficiais

Em função dos riscos significantes de recidiva e progressão da doença, o seguimento dos pacientes portadores de tumores vesicais superficiais é realizado de forma rigorosa, com intuito de se detectar precocemente a recorrência da doença. Com o tratamento imediato, pode-se evitar a progressão para estádios mais avançados e de pior prognóstico, poupando o paciente de terapias mais agressivas e diminuindo o risco de óbito. Já foi demonstrado que pacientes com câncer de bexiga músculo-invasivo operados em até três meses após o diagnóstico têm maior sobrevida específica livre de doença e maior sobrevida global ^(9, 10).

Diretrizes internacionais recomendam que o seguimento dos pacientes com tumor vesical seja feito durante toda a vida, o qual inclui exames de urina, estudos de imagem e exames endoscópicos (cistoscopia) ⁽¹¹⁾. Estes últimos, por sua vez, elevam os custos e agregam morbidade devido ao caráter invasivo do exame. Além disso, por causa do regime de seguimento intenso e das altas taxas de complicações cirúrgicas, o

carcinoma vesical atualmente é uma das neoplasias mais caras de se tratar ⁽¹²⁾. Em um estudo analisando pacientes diagnosticados com carcinoma urotelial superficial, mostrou-se que o custo anual do seguimento *per capita* passou de U\$ 6.936,00 em 1993 para U\$ 7.642,00 em 2002, provavelmente decorrente do aumento da frequência na realização de exames endoscópicos ⁽¹³⁾. Em hospitais privados de São Paulo, o preço da cistoscopia oscila entre R\$ 970,00 e R\$ 2.780,00. Mais ainda, nos Estados Unidos da América são gastos U\$ 150.000,00 anualmente por paciente com neoplasia vesical músculo-invasiva e no Reino Unido calcula-se que para cada paciente salvo com doença localmente avançada sejam dispendidos cerca de R\$ 7.8 milhões ^(14, 15). Dessa forma, grandes esforços têm sido empregados na prospecção de novos métodos, menos onerosos e invasivos, para detecção precoce da recidiva de tumores vesicais, que simplificassem o seguimento e melhorassem na qualidade de vida dos pacientes. Por conseguinte, seriam poupados gastos com o tratamento mais complexo da doença avançada.

1.3 Biomarcadores urinários

Com o propósito de identificar precocemente recidivas tumorais, diversos testes com biomarcadores urinários para a neoplasia vesical foram desenvolvidos. Entre os principais incluem-se o BTA Stat, NMP22, Urovision, Immunocyt e teste UBC. Apesar dos esforços, a aplicação desses testes na prática clínica apresenta inconvenientes não resolvidos.

O BTA Stat é um ensaio imunográfico que detecta fatores tumorais capazes de bloquear a resposta imune do paciente ao câncer. Apesar de ser um teste de rápida realização, apresenta resultados heterogêneos, com 57-83% de sensibilidade e 60-92% de especificidade ^(16, 17). Além disso, a chance de falsos positivos chega a 80% quando coexistem processos inflamatórios do trato urinário.

O NMP22 é uma proteína nucleica liberada de células apoptóticas, detectada por técnica de imunoensaio na urina de pacientes com tumor vesical. Sua sensibilidade e especificidade para o diagnóstico desta neoplasia oscilam, respectivamente, entre 47-100% e 60-90% ^(16, 17). No entanto, para a detecção de recorrência, a sensibilidade da NMP22 é em torno de 50-56% e seus níveis também podem aumentar falsamente na presença de inflamações do trato urinário ou até mesmo após cistoscopias ^(18, 19).

O Urovysion é um teste de imunofluorescência (FISH) que identifica aneuploidias dos cromossomos 3, 7 e 17 ou a perda do 9p21, frequentemente encontradas nos carcinomas transicionais. Sua sensibilidade é de 70% e especificidade de 80% ⁽²⁰⁾. Entre suas virtudes está a capacidade de antever a recidiva do tumor vesical, com acerto de até 85% ⁽²¹⁾. Contudo, o Urovision é um teste caro, examinador dependente, com poucos profissionais capacitados para realizá-lo e que requer instalações laboratoriais avançadas.

O Immunocyt também é um ensaio de FISH para a detecção de antígenos tumorais vesicais, com sensibilidade que varia de 50-100% e especificidade de 69-79% ⁽²²⁻²⁴⁾. Esse teste tem boa eficácia para tumores de baixo grau, os quais dificilmente são detectados com outros métodos ⁽²⁵⁾. Porém, para realizá-lo também é necessário um aparato laboratorial complexo e observa-se um alto índice de falsos positivos na presença de hiperplasia benigna prostática e cistites.

Por último, o teste UBC avalia quantitativamente a presença da citoqueratina 8 e 18 na urina, que se elevam quando ocorre morte celular em neoplasias vesicais. Em um estudo publicado por Sanchez-Carbayo e col. a sua sensibilidade foi de 59% e especificidade de 86% ⁽²⁶⁾. Apesar da alta especificidade, em outros dois grandes estudos que avaliaram a acurácia desse teste, a sensibilidade foi inferior a 50%, revelando resultados ainda heterogêneos e que exigem melhor investigação ^(27, 28).

Diante dessas circunstâncias, ainda se busca um biomarcador urinário mais eficiente para identificar a presença de neoplasias vesicais, com boa acurácia, preço acessível e de execução simples. Além disso, seria valioso para a prática clínica identificar marcadores que além de detectar a recorrência, estratificassem os pacientes com maior risco de progressão, indicando os casos que deveriam ser submetidos a uma vigilância mais rigorosa, com cistoscopias mais frequentes, ou tratamento radical precoce.

Deve ser enfatizado que pacientes com carcinoma urotelial superficial de bexiga muitas vezes são submetidos a tratamento complementar à ressecção endoscópica, com a instilação intra-vesical de bacilos Calmette-Guérin (BCG) atenuados ⁽¹¹⁾. Essa terapia adjuvante almeja reduzir a recidiva tumoral em grupos de maior risco através do estímulo de uma reação inflamatória na bexiga, capaz de combater células neoplásicas ⁽³⁾. Considerando esse cenário, é crucial que os biomarcadores urinários para câncer de bexiga não sejam falsamente alterados em pacientes previamente tratados com BCG intra-vesical.

Evidências prévias mostraram a associação positiva entre outros biomarcadores urinários e neoplasias malignas. Entre eles, cinco proteínas destacam-se por apresentar uma boa sensibilidade para a detecção de diferentes tipos de câncer: o inibidor da

ativação do plasminogênio 1 (PAI-1), a DJ-1, a apolipoproteína A1 (ApoA-1), a metaloproteinase 9 (MMP-9) e a interleucina 8 (IL-8).

A PAI-1 (ou Serpina E1) desempenha papel central na cascata de fibrinólise, inibindo a ativação do plasminogênio e da uroquinase ⁽²⁹⁾. Na ausência destas enzimas trombolíticas, ocorre o aumento do depósito de coágulos e fibrina no microambiente peri-tumoral favorecendo a angiogênese e a estabilidade da adesão entre as células neoplásicas ⁽³⁰⁾. Condições de estresse (ex: hipóxia; radiação) estimulam a expressão de PAI-1, mediada por fatores de crescimento (EGF, TGF- β), citocinas (MAPK, IFN- γ , TNF- α , leptina, IL-1, IL-6) e micro RNAs (miR 143, miR 145, miR 30b) ⁽³¹⁻⁴²⁾. A PAI-1 também tem capacidade de estimular a migração das células tumorais sinalizando diretamente pela via da serina / threonina quinase (PI3K/Akt) ⁽⁴³⁾. No endotélio, a PAI-1 atua através de integrinas favorecendo a passagem de células tumorais para a formação de implantes a distância ⁽³⁰⁾. Ainda, pela via FasL, reduz a apoptose de células endoteliais e consequentemente favorece a angiogênese ^(44, 45).

Na prática clínica, foi demonstrado que a hiperexpressão da PAI-1 está associada ao pior prognóstico em neoplasias gástricas, de mama e ovário ^(29, 46, 47). Um estudo experimental que utilizou camundongos xeno-enxertados com carcinoma urotelial revelou que, na deficiência e na hiperexpressão de PAI-1, ocorre a diminuição e o aumento do volume tumoral, respectivamente ⁽⁴⁸⁾. Recentemente foi demonstrada a diminuição da sobrevida global em pacientes portadores de carcinoma urotelial que possuíam a elevação da expressão da PAI-1, avaliada por ensaio imuno-histoquímico em peças cirúrgicas ⁽⁴⁹⁾. Becker e col. compararam retrospectivamente a expressão de PAI-1 no tecido tumoral, no sangue e na urina entre pacientes com carcinoma urotelial e indivíduos saudáveis. Os autores encontraram elevação do

biomarcador nos pacientes acometidos pela neoplasia em amostras de tecido e sangue, mas não de urina ⁽⁵⁰⁾. Urquidi e col. analisaram por ELISA a urina de 64 portadores de câncer de bexiga e de 63 indivíduos saudáveis. Estes autores reportaram uma acurácia de 69% da PAI-1 para o diagnóstico de neoplasia urotelial (sensibilidade = 42%; especificidade = 100%) ⁽⁵¹⁾. Estudos clínicos avaliando a associação da PAI-1 e câncer de bexiga são escassos e, em nosso conhecimento, até hoje nenhum ensaio avaliou o papel desse biomarcador para a monitorização da recidiva do carcinoma urotelial.

A DJ-1 é codificada pelo oncogene PARK-7 e historicamente destaca-se pela associação com o desenvolvimento da doença de Parkinson, uma vez que seu bloqueio aumenta a apoptose de células do sistema nervoso em situações de hipóxia ^(52, 53). De maneira oposta, a hiperexpressão da DJ-1 promove a angiogênese, modula o metabolismo glicolítico e inibe a apoptose, favorecendo a tumorigênese ^(54, 55). Sua ação ocorre através da via PI3K/Akt/mTOR, controlando a transcrição de diversos genes, entre eles o do HIF-1, PTEN e p53 ^(54, 56). O aumento da expressão da DJ-1 foi descrito em neoplasias de pulmão, mama e ovário ^(57, 58).

Até hoje, somente dois estudos avaliaram a relação da DJ-1 e o câncer de bexiga. Lee e col. analisaram amostras de tecido de carcinoma urotelial de 102 pacientes por ensaio imuno-histoquímico e reportaram uma associação entre tumores invasivos e a hiperexpressão desta proteína ⁽⁵⁹⁾. Kumar e col. demonstraram num painel proteômico analisado por ELISA que a DJ-1 está elevada na urina de pacientes com câncer de bexiga. Em conjunto com outros três biomarcadores, a acurácia para a detecção de neoplasia vesical superficial e musculo-invasiva foi de 85% e 90%, respectivamente ⁽⁶⁰⁾.

A ApoA1 é um dos principais componentes da molécula de colesterol de alta

densidade (HDL), que desempenha papel fundamental no transporte de lipídios dos tecidos periféricos até a metabolização hepática ⁽⁶¹⁾. Há uma década, Ahn e col. notaram num estudo populacional com cerca de 29 mil participantes que pacientes com altos níveis de HDL no sangue tinham menos risco de desenvolver neoplasias hematopoiéticas, de próstata, pulmão e fígado ⁽⁶²⁾. Posteriormente, Jafri e col. analisaram 24 ensaios prospectivos com um total de 145 mil participantes e reportaram que para cada decréscimo de 10 mg/dl no HDL sérico, há uma redução de 36% no risco de desenvolver qualquer tipo de câncer ⁽⁶³⁾. Outros estudos confirmaram a correlação inversa dos níveis séricos de HDL e o risco de diversas neoplasias ⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

O mecanismo de ação que confere à ApoA-1 o efeito anti-oncogênico ainda não é completamente conhecido, mas sabe-se que esta molécula tem papel anti-inflamatório, anti-apoptótico e anti-oxidativo ⁽⁶⁶⁾. Estudos experimentais revelaram que altas concentrações de ApoA-1 em tecido tumoral e peri-tumoral diminui a expressão da MMP-9 (associada à formação de metástases), reduz a angiogênese e modula a inflamação a favor da supressão tumoral ⁽⁶⁷⁾. A ApoA-1 é capaz de ativar macrófagos M1 através da ATF3 (*activator of transcription factor 3*) e diminuir a atividade de macrófagos M2 ⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾. Os macrófagos M1, por sua vez, apresentam atividade antitumoral. Ao contrário, já foi demonstrado em humanos que a infiltração de macrófagos M2 em carcinoma urotelial de bexiga está associada à redução da sobrevida câncer-específica ⁽⁷²⁾. Shang e col. avaliaram 470 pacientes com câncer de bexiga e identificaram que indivíduos com níveis séricos de ApoA-1 mais elevados têm maior sobrevida câncer-específica (94% vs. 88%; $p < 0,001$) ⁽⁷³⁾. De maneira curiosa, na presença do carcinoma urotelial a expressão de ApoA-1 na urina e no sangue se comportam de maneiras opostas, ou seja, o biomarcador encontra-se elevado na urina de

pacientes acometidos pela neoplasia ⁽⁷⁴⁾. Estudos que compararam as taxas de ApoA-1 na urina entre pacientes com carcinoma urotelial e indivíduos saudáveis mostraram a acurácia para o diagnóstico de neoplasia variando de 87% a 95% ^(75, 76). Apesar dos dados citados, atualmente não existem estudos que avaliaram o papel da ApoA-1 para o seguimento de carcinoma urotelial.

A MMP-9 é uma enzima proteolítica da família das endopeptidases dependentes de zinco, que desempenha um papel central na modelação da matriz extracelular (MEC). Através da degeneração de moléculas tais como o colágeno, laminina, fibronectina, tenascina, gelatinas e proteoglicanos, a MMP-9 remove ligações proteicas no estroma intersticial eliminando barreiras físicas para o desprendimento celular ⁽⁷⁷⁾. A degradação da membrana basal e do endotélio favorece a migração de células tumorais para a formação de metástases ⁽⁷⁸⁾. Além disso, a ação da MMP-9 na organização do estroma do microambiente peri-tumoral contribui para a angiogênese ⁽⁷⁷⁾.

A associação desta proteína com o potencial metastático de diversos tipos de tumores já foi descrita ⁽⁷⁹⁻⁸⁴⁾. Ramon de Fata e col. demonstraram que a MMP-9 sérica está elevada em pacientes com carcinoma urotelial quando comparados à indivíduos saudáveis. A acurácia reportada deste biomarcador para teste diagnóstico foi de 95% ⁽⁸⁵⁾. Outros estudos demonstraram que a expressão urinária de MMP-9 tem correlação direta com a agressividade do tumor vesical ^(86, 87). O poder diagnóstico da MMP-9 urinária só foi analisado dentro de painéis proteicos, porém sempre confirmando sua relação com a presença de carcinoma urotelial ⁽⁸⁸⁾.

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, secretada por neutrófilos, monócitos, células endoteliais, mesoteliais e tumorais ⁽⁸⁹⁾. A ação oncogênica da IL-8 se dá principalmente pelas vias PI3K/Akt e Raf/MEK/ERK, que promovem a proliferação,

sobrevivência e migração celular ^(90, 91). Esta relação já foi demonstrada em linhagens tumorais de diversos órgãos ⁽⁹¹⁻⁹⁷⁾. A IL-8 também estimula a proliferação endotelial necessária à angiogênese e aumenta a permeabilidade vascular, que contribui para o desenvolvimento de metástases ^(89, 98, 99). Além disso, atuando sobre a regulação da expressão da MMP-9 e MMP-2, a IL-8 tem influência sobre a migração de células tumorais ^(86, 98).

Estudos em modelos animais xeno-enxertados demonstraram que a hiperexpressão de IL-8 está associada à ocorrência da angiogênese e formação de metástases ⁽⁹⁹⁻¹⁰⁵⁾. Um estudo prévio do nosso grupo analisou a expressão da IL-8 e MMP-9 através de PCR em tecido de carcinoma urotelial. Ambas as proteínas se mostraram substancialmente elevadas em pacientes com tumores mais graves ⁽⁸⁶⁾. Urquidí e col. compararam pacientes com carcinoma urotelial com indivíduos hígidos e encontraram a IL-8 urinária significativamente aumentada no grupo com neoplasia. Pacientes com a IL-8 elevada apresentaram risco 1,51 vezes maior de serem diagnosticados com câncer de bexiga do que o grupo controle ⁽¹⁰⁶⁾.

Rosser e col. analisaram um painel de oito proteínas na urina de pacientes com neoplasia vesical. Entre os biomarcadores avaliados, a MMP9, a IL8 e a PAI-1 tiveram a associação de maior força com a presença do tumor, com acurácia quase igual ao painel com as oito proteínas juntas (86% vs. 88%) ⁽¹⁰⁷⁾. Apesar dos resultados promissores, até hoje o papel antecipatório destes biomarcadores urinários para a recorrência do carcinoma urotelial de bexiga não foi estudado.

Em suma, as proteínas mencionadas possuem diferentes papéis essenciais à oncogênese (figura 1) e destacam-se pelos resultados promissores já reportados na literatura. Essas proteínas foram eleitas para presente estudo devido ao potencial para

diagnóstico de recidiva, à originalidade ou por pertencerem a uma linha de pesquisa do laboratório de investigação médica da nossa instituição (MMP-9 e IL-8). Transferindo os conhecimentos atuais para prática clínica, talvez seja possível maximizar a eficiência desses testes utilizando um painel com as cinco proteínas juntas, como biomarcadores urinários para a detecção de recidivas e antecipação de recorrência tumoral.

Figura 1. Papel das proteínas analisadas na oncogênese. Gráficos fornecidos pelo Cancer Hallmarks Analytics Tool (<http://chat.lionproject.net/>).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários

Avaliar se o nível urinário das proteínas PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8 permite identificar recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga.

Avaliar se o nível urinário das proteínas PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8 permite antecipar quais pacientes terão recidiva futura de carcinoma urotelial superficial de bexiga.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar se a aplicação de BCG intra-vesical tópico altera os níveis urinários das proteínas PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8.

3. MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, não randomizado.

3.2 Pacientes, local e época

Foram selecionados 201 pacientes que compareceram ao ambulatório de urologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) para se submeterem à cistoscopia, entre 01 de agosto de 2013 e 30 de novembro de 2013. Não houve restrição de idade e nem de sexo para a seleção. Foram incluídos pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga com estágio Ta-T1, de alto ou baixo grau histológico, já tratados com ressecção local e em seguimento ambulatorial. Os critérios de exclusão compreenderam a presença de sonda ou cateter no trato urinário, aplicação de BCG intra-vesical no mês que antecedeu a cistoscopia e diagnóstico concomitante de outras neoplasias. Seguindo esses critérios, foram incluídos 152 pacientes no presente estudo (figura 2).

Figura 2. População do estudo.

3.3 Desenho do estudo e desfechos

Na primeira etapa, a urina dos pacientes foi coletada e armazenada momentos antes da cistoscopia. Os cinco biomarcadores urinários (PA-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8) foram mensurados por ELISA e seus níveis comparados entre pacientes com ($N = 16$) e sem ($N = 136$) recidiva tumoral na ocasião da coleta da urina. Na segunda etapa, indivíduos com recidiva foram excluídos e a população restante ($N = 136$) foi seguida por uma mediana de 47 meses. Os níveis dos cinco biomarcadores urinários foram então comparados entre pacientes com ($N = 21$) e sem ($N = 115$) recidiva tumoral durante o

seguimento (valor antecipatório). O seguimento clínico foi realizado com consultas e exames semestrais, que incluíram ultrassom de bexiga, citologia oncológica urinária e cistoscopia ambulatorial. Pacientes com exames alterados foram submetidos a ressecção transuretral de bexiga em centro cirúrgico. O diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial foi considerado quando confirmado por análise histopatológica da peça cirúrgica.

Dados do uso prévio de BCG tópico intra-vesical foram coletados e relacionados com os níveis urinários da PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8, incluindo se os pacientes estavam em esquema de indução ou manutenção terapêutica, se o tratamento era vigente ou já havia terminado e o tempo entre a última aplicação do BCG e a coleta da urina.

A urina foi coletada em dois frascos secos estéreis e refrigerados (4°C) até serem transferidos ao Laboratório de Investigação Médica da divisão de urologia (LIM 55), onde foram armazenados com a mesma temperatura.

Para a mensuração dos cinco biomarcadores por ELISA, inicialmente preparou-se a diluição padrão, produzida com tampão diluente padrão conforme instrução do fabricante. A seguir, a diluição seriada do padrão do *kit* foi executada para controle do método. A leitura dos marcadores padrões apresentou o perfil desejado e, portanto, a técnica foi considerada correta. A diluição do padrão foi adicionada na placa 50 µl de urina de cada paciente em duplicata, conforme os protocolos convencionais. A placa foi tampada e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Então a solução foi lavada quatro vezes com um tampão de lavagem próprio do *kit* e os poços foram secos com papel toalha. Biotina conjugada (100 µl) foi adicionada aos poços da placa, que foi incubada por mais uma hora em temperatura ambiente. Após um novo processo de

lavagem, 100 µl de estreptavidina-HRP foi adicionado aos poços e a placa foi outra vez incubada por 30 min em temperatura ambiente. Um terceiro processo de lavagem foi repetido. Posteriormente 100 µl de cromógeno estabilizado foi colocado nos poços e a placa foi novamente incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, 100 µl de *stop solution* foi acrescentada e então foi feita a análise no leitor de ELISA a 450 nm.

3.4 Ética

Todos os pacientes incluídos no estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assegurando-se confidencialidade dos dados avaliados. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Instituição (número do parecer 1.294.128).

3.5 Cálculo da amostra

O tamanho da amostra foi calculado levando em consideração o risco de recorrência dos tumores vesicais superficiais. O desvio padrão e a diferença esperada foram calculados baseados nos resultados de um estudo anterior realizado por nosso grupo, que analisou a expressão da MMP-9 e IL-8 em tecido de tumor vesical ⁽⁸⁶⁾. Desta forma, o tamanho mínimo da amostra para um teste bicaudal com nível de significância de 5% e poder de teste de 95% foi 53 de pacientes.

3.6 Análise estatística

Variáveis categóricas foram descritas como número e porcentagem. As variáveis quantitativas, descritas por média e mediana, foram analisadas pelo teste *T* quando paramétricas ou teste *Mann-Whitney*, quando não paramétricas. Curvas ROC foram utilizadas para determinar a sensibilidade e especificidade de cada proteína para o diagnóstico de recidiva do carcinoma urotelial de bexiga.

O melhor valor de sensibilidade e especificidade foram eleitos através do índice de Youden, com fim de determinar o valor de corte de cada biomarcador utilizado para categorizar os pacientes. A ocorrência de recidiva tumoral foi comparada entre os pacientes com biomarcadores a cima ou abaixo do valor de corte, através do teste *exato de Fisher* ou *Chi* - proteínas foram incluídas na análise do painel dos biomarcadores quando o valor de $p < 0,1$. A performance dos painéis foi testada com o teste *exato de Fisher* ou *Chi* e considerada significativa quando $p < 0,05$.

A razão de risco (RR) foi calculada para os painéis e considerada significativa quando o intervalo de confiança (IC) de 95% não continha o valor 1,0 ou $p < 0,05$. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia foram calculados para os painéis (Anexos A e B). Uma análise de regressão logística com o teste ANOVA foi realizada para verificar se o uso BCG exerceu influência sobre os resultados da associação dos biomarcadores e a recidiva tumoral.

Curvas de sobrevida (Kaplan-Maier) foram construídas para avaliar o poder de predição da recidiva do carcinoma urotelial de bexiga do painel de proteínas (PAI-1 e IL-

8), utilizando o valor de corte determinado pelo índice de Youden. As análises foram realizadas com o programa *SPSS*[®] versão 19.0 (*SPSS*[®] Inc; Ilinois, EUA). Somente testes bicaudais foram considerados e o restante dos resultados foram interpretados como significantes quando o valor de p foi $< 0,05$.

4. RESULTADOS

Entre os 152 pacientes incluídos, 16 (10,5%) apresentaram carcinoma urotelial de bexiga na ocasião da coleta da urina. Após a exclusão dos indivíduos com tumor, 136 pacientes foram selecionados para avaliar o papel antecipatório dos biomarcadores urinários, entre os quais 21 (13,8%) apresentaram recidiva tumoral ao longo do seguimento estabelecido. As características da população estudada estão expostas na tabela 1. Havia dados completos da ressecção do tumor primário de 134 pacientes. Entre os pacientes que apresentaram recidiva tumoral (N = 37), 35 foram submetidos à cirurgia após o diagnóstico e dispunham de dados anátomo-patológicos completos. Dois pacientes tiveram recidiva tumoral diagnosticada em biópsia da lesão suspeita realizada na cistoscopia ambulatorial. Ambos não realizaram tratamento cirúrgico: o primeiro apresentou doença metastática e faleceu antes da ressecção do tumor e o segundo não compareceu à consulta de seguimento.

Tabela 1. Características clínicas da população.

Variável	Frequência
	Número (%) ou Média $\pm$ DP
Sexo masculino	99 (65,1%)
Idade (anos)	65,3 $\pm$ 12,4
Tabagistas	114 (75%)
BCG intra-vesical prévio	102 (67,1%)
Tumor primário (N 134)	
Lesões múltiplas	57 (42,9%)
Lesão $\geq$ 10 mm	116 (87,2%)
Estagio Ta / T1	85 (63,4%) / 49 (36,6%)
Alto grau	68 (50,7%)
CIS presente	7 (5,2%)
Recidiva tumoral (N 35)	
Lesões múltiplas	21 (60%)
Lesão $\geq$ 1cm	25 (71,4%)
Estagio Ta / T1	28 (80%) / 7 (20%)
Alto grau	14 (40%)
CIS presente	8 (22,8%)

DP = Desvio padrão; N = número; CIS = Carcinoma *in situ*

A relação das proteínas urinárias com os dados clínicos e com as características do tumor primário da coorte está sumarizada nas tabelas 2 e 3. A mediana de seguimento de toda coorte foi de 47 meses (interquartil de 25% e 75%: 40 e 50 meses). O número de pacientes que completou 2, 3 e 4 anos de seguimento foi de 129, 119 e 65, respectivamente.

Tabela 2. Relação do nível dos biomarcadores urinários e os dados clínicos dos pacientes.

Variável	N	PAI-1	p	DJ-1	p	ApoA-1	p	MMP-9	p	IL-8	p
		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP	
Idade											
< 65 anos	78	-0,293±0,22	0,93	0,185±0,42	0,97	0,283±0,64	0,87	0,405±0,93	0,67	0,570±0,9	0,98
≥ 65 anos	74	-0,289±0,23		0,182±0,43		0,266±0,60		0,473±1,03		0,566±1,07	
Tabagismo											
Não	38	-0,345±0,20	0,10	0,116±0,29	0,26	0,323±0,63	0,58	0,437±1,04	0,99	0,547±1,12	0,89
Sim	114	-0,273±0,24		0,206±0,45		0,258±0,62		0,438±0,96		0,574±0,93	

DP = Desvio padrão

Tabela 3. Relação do nível dos biomarcadores urinários e os dados da RTU de bexiga antes da coleta de urina (N 134).

Variável		PAI-1	p	DJ-1	p	ApoA-1	p	MMP-9	p	IL-8	p
		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP	
N de lesões											
=1	76	-0,328±0,21	0,02	0,172±0,44	0,70	0,205±0,56	0,30	0,367±0,93	0,37	0,496±0,97	0,24
≥ 2	57	-0,230±25		0,202±0,43		0,314±0,63		0,525±1,06		0,706±1,05	
Tamanho											
≤ 10 mm	17	-0,360±0,17	0,17	0,218±0,50	0,74	0,283±0,62	0,82	0,575±1,21	0,54	0,819±1,02	0,31
>10 mm	116	-0,275±0,24		0,180±0,42		0,247±0,59		0,415±0,96		0,552±1,01	
Grau											
Baixo	66	-0,297±0,25	0,63	0,183±0,39	0,94	0,280±0,64	0,62	0,402±0,95	0,72	0,592±0,92	0,92
Alto	68	-0,277±0,22		0,178±0,47		0,228±0,54		0,465±1,02		0,573±1,09	
CIS											
Não	127	-0,286±0,24	0,89	0,187±0,44	0,49	0,245±0,60	0,49	0,420±0,98	0,49	0,562±0,00	0,33
Sim	7	-0,299±0,17		0,067±0,23		0,407±0,42		0,684±1,04		0,948±1,25	
Estágio*											
Ta	85	-0,299±0,23	0,45	0,152±0,38	0,85	0,258±0,62	0,75	0,445±1,01	0,35	0,538±0,96	0,22
T1	49	-0,270±0,23		0,236±0,53		0,249±0,56		0,427±1,00		0,652±1,13	

* Kruskal Wallis / DP = Desvio padrão / CIS = Carcinoma *in situ*

4.1 Associação dos biomarcadores e o diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga.

A ApoA-1, IL-8 e MMP-9 foram selecionadas para o painel de biomarcadores para o diagnóstico de recidiva (figura 3). As curvas ROC utilizadas para determinar o valor de corte de cada proteína estão ilustradas na figura 4. Os valores de corte dos níveis da ApoA-1, MMP-9 e IL-8 utilizados para a categorização dos pacientes foram 0,424, 0,262 e 1,117, respectivamente. ApoA-1 ($p=0,024$), MMP-9 ($p=0,005$) e IL-8 ($p=0,002$) foram significativamente associadas com a recidiva tumoral diagnosticada na ocasião da coleta de urina (Tabela 4). O painel de biomarcadores mostrou-se significativo para determinar o diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga ($RR=12,9$; $IC\ 95\% =2,8-57$). A sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do painel foram 37,5%, 95,5%, 50%, 92,8% e 89,4%, respectivamente.

Figura 3. Nível dos biomarcadores entre pacientes sem e com diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga (N 135 vs. 16).

Figura 4. Curvas ROC dos níveis dos biomarcadores urinários para o diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga (N =152): (A) PAI-1 (B) DJ-1, (C) ApoA-1, (D) MMP-9 e (E) IL-8.

Tabela 4. Razão de risco de diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga quando os biomarcadores estão a cima do valor de corte.

	Recidiva		RR	IC 95%	<i>p</i>
	Não	Sim			
ApoA-1					
< 0,424	72,4%	5,9%	1,0	1,1 - 9,7	0,024
≥ 0,424	17,1%	4,6%	3,3		
MMP-9					
< 0,262	72,2%	5,3%	1,0	1,4 - 12,2	0,005
≥ 0,262	17,2%	5,3%	4,2		
IL-8					
< 1,117	58,3%	2,6%	1,0	1,7 - 18,4	0,002
≥ 1,117	31,1%	8%	5,6		
Painel com as três proteínas					
Normal	85,4%	6,6%	1,0	3,5 - 47,4	< 0,001
Alterado	4%	4%	12,9		

RR = Razão de risco; IC = Intervalo de confiança

4.2 Associação dos biomarcadores e a previsão de recidiva de carcinoma urotelial superficial de bexiga durante o seguimento (valor antecipatório).

A PAI-1 e IL-8 foram selecionadas para o painel de biomarcadores para prever a recidiva futura de carcinoma urotelial de bexiga. Os valores de corte dos níveis da PAI-1 e IL-8 utilizados para a categorização dos pacientes foram -0,266 e 0,047, respectivamente. A PAI-1 ($p = 0,023$) e IL-8 ($p = 0,06$) mostraram-se aumentadas em pacientes que tiveram recidiva tumoral diagnosticada na ocasião da coleta de urina (tabela 5). Após a regressão logística, a PAI-1 manteve-se como uma variável independente do uso BCG para determinar maior risco de recidiva futura ($p = 0,038$). O

painel de biomarcadores mostrou-se significativo para antecipar o diagnóstico de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga (RR =4,1; IC 95% =1,4 - 11,4). A sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do painel foram 38,1%, 86,8%, 34,8%, 88,4% e 79,3%, respectivamente. A figura 5 ilustra a curva de sobrevida livre de recidiva em pacientes com e sem o painel alterado (p =0,002).

Tabela 5. Razão de risco para predição de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga quando os biomarcadores estão a cima do valor de corte.

	Recidiva		RR	IC 95%	p
	Não	Sim			
PAI-1					
< - 0,266	58,1%	6,6%	1,0	1,1 - 7,6	0,023
≥ - 0,266	26,5%	8,8%	2,9		
IL-8					
< 0,047	43%	4,4%	1,0	0,94 - 7,1	0,06
≥ 0,047	41,5%	1,1%	2,6		
Painel com as duas proteínas					
Normal	73,3%	9,6%	1,0	1,4 - 11,4	0,005
Alterado	11,1%	5,9%	4,1		

RR = Razão de risco; IC = Intervalo de confiança

Figura 5. Curva de sobrevida livre de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga. Tempo médio para recidiva tumoral no grupo controle e no grupo com PAI-1 e IL-8 alteradas de 53,9 meses e 39,1 meses, respectivamente (teste Long Rank).

4.3 Influência da aplicação prévia de BCG intra-vesical na expressão dos biomarcadores

Pacientes submetidos e não submetidos à aplicação intra-vesical de BCG tiveram 16,5% e 14% de recidiva tumoral, respectivamente ($p = 0,707$). O nível urinário da PAI-1 estava significativamente aumentado em pacientes que haviam aplicado BCG intra-vesical ($p = 0,02$) (tabela 6), mas não houve associação entre a fase do tratamento intra-vesical com BCG (indução ou manutenção) e a expressão dos biomarcadores. Também não houve correlação entre a proximidade do tratamento (em curso ou finalizada) com a expressão dos biomarcadores (figura 6).

Tabela 6. Relação do nível dos biomarcadores urinários e os dados da aplicação de BCG

Variável	N	PAI-1	p	DJ-1	p	ApoA-1	p	MMP-9	p	IL-8	p
		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP	
BCG intra-vesical											
Não	50	-0,345±0,19	0,02	0,145±0,29	0,43	0,280±0,63	0,94	0,447±0,96	0,94	0,558±0,95	0,93
Sim	102	-0,260±0,24		0,203±0,47		0,272±0,62		0,434±0,99		0,573±1,00	
Aplicação											
Em curso	60	-0,255±0,27	0,67	0,207±0,47	0,58	0,263±0,56	0,71	0,492±1,08	0,54	0,576±1,02	0,96
Finalizada	42	-0,266±0,20		0,195±0,49		0,283±0,70		0,352±0,86		0,566±0,99	
Status											
Indução	15	-0,189±0,33	0,35	0,298±0,53	0,35	0,428±0,72	0,67	0,891±1,39	0,31	0,721±1,15	0,70
Manutenção	45	-0,278±0,24		0,177±0,44		0,208±0,49		0,356±0,94		0,527±0,98	

BCG = Bacilo Calmette-Guérin / DP = Desvio padrão

Figura 6. Gráficos de dispersão e fator de correlação de Pearson da correlação entre o nível dos biomarcadores e o intervalo entre a última aplicação de BCG e a coleta de urina: (A) PAI-1, (B) DJ-1, (C) ApoA-1, (D) MMP-9 e (E) IL-8.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado se os níveis urinários de PAI-1, DJ-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8 permitem diagnosticar e prever a recidiva de carcinoma urotelial de bexiga. A expressão aumentada de ApoA-1, MMP-9 e IL-8 mostrou-se associada ao diagnóstico de recidiva da neoplasia e a expressão aumentada de PAI-1 e IL-8 relacionou-se com o maior risco de recidiva futura da doença. Painéis compreendendo as proteínas mencionadas apresentaram resultados mais significantes do que o das proteínas isoladas, com acurácia para o diagnóstico e para prever recidivas futuras de aproximadamente 89% e 79%, respectivamente. Além disso, o uso prévio de BCG não interferiu na expressão das proteínas avaliadas no presente estudo.

Outros autores descreveram o uso de painéis de proteínas analisadas por ELISA com acurácia elevada para o diagnóstico de câncer de bexiga. Kumar e col. Selecionaram cinco biomarcadores a partir de uma análise proteômica, entre elas a DJ-1, e construíram um painel com acurácia de 92% e 94% para a detecção de tumores de bexiga com estagio Ta/T1 e T2/T3, respectivamente ⁽⁶⁰⁾. De forma similar, Rosser e col. reportaram os resultados de um painel com sete proteínas para o diagnóstico de câncer de bexiga, com acurácia de 88% e que incluiu a PAI-1, MMP-9 e IL-8 ⁽¹⁰⁷⁾. Ambos os estudos compararam pacientes portadores de tumor vesical no momento da coleta da urina com indivíduos saudáveis sem história prévia de tumor vesical.

Apesar da elevada acurácia para o diagnóstico primário, o desenho dos estudos mencionados é inapropriado para analisar o papel das proteínas para a detecção de recidiva de câncer de bexiga. Recentemente, Frantz e col. avaliaram uma coorte com 636 indivíduos em seguimento de neoplasia vesical utilizando um painel com 106 proteínas, entre as quais estava a ApoA-1. Foram comparados pacientes que apresentaram recidiva tumoral (21%) com aqueles que permaneceram sem recidiva num

seguimento de 1 ano. A acurácia do painel proteico para o diagnóstico de recidiva foi de 75% (sensibilidade=88% e especificidade=51%; $p < 0,001$) ⁽¹⁰⁸⁾. Apesar do painel amplo, a acurácia reportada foi menor do que nos estudos anteriores, possivelmente porque o grupo controle era constituído por pacientes já tratados de neoplasia vesical, ao invés de indivíduos saudáveis.

Considerando a hipótese de que o câncer de bexiga é uma doença de campo, fatores carcinogênicos excretados na urina nos grupos de risco podem causar alterações estruturais no DNA de células de todo urotélio ⁽³⁾. Desta forma, pacientes já tratados talvez apresentem anomalias na expressão proteica, independente da presença de um tumor. Corroborando esta hipótese, Soukup e col. detectaram alteração em 17 de 24 proteínas na urina de pacientes com diagnóstico primário de câncer de bexiga quando comparados a pacientes saudáveis. Utilizando o mesmo painel, desta vez comparando indivíduos com recidiva de câncer de bexiga e indivíduos com história prévia de câncer de bexiga sem recidiva, somente quatro proteínas estavam alteradas ⁽¹⁰⁹⁾.

As queixas clínicas que fazem os pacientes portadores de câncer de bexiga procurarem auxílio médico pela primeira vez estão, geralmente, relacionadas com tumores de maior volume. Nesta circunstância, espera-se que a expressão de proteínas anômalas seja exuberante e, portanto, sejam mais fáceis de se detectar numa análise de urina. Ao contrário, durante o seguimento almeja-se identificar recidivas precocemente, antes de surgirem sintomas, quando o tumor ainda tem pequeno volume e provavelmente menor número de anomalias de expressão proteica. Além disso, os exames utilizados para diagnóstico de câncer de bexiga são precisos e representam uma intervenção pontual na evolução do paciente. Já no seguimento, a repetição de cistoscopias seriadas traz embargos financeiros e psicológicos aos doentes, impondo a

necessidade de aprimoramentos do processo ⁽¹²⁾. Nesse contexto, o presente estudo é um dos poucos que utilizou um grupo controle constituído de indivíduos com tumor vesical tratado e sem recorrência, ao invés de indivíduos saudáveis.

Outros obstáculos embargam a aplicação dos biomarcadores para câncer de bexiga na prática clínica. Primeiro, muitos dos estudos existentes utilizam urina proveniente de biobancos, que está sujeita a riscos de mal armazenamento. Proteínas são estruturas instáveis e se mal estocadas podem se degradar, prejudicando sua análise quantitativa e qualitativa.

Segundo, as coortes estudadas até hoje são heterogêneas, compreendendo casos com tumores de diferentes estágios e graus de agressividade. Idealmente, as populações eleitas para estudo deveriam ser específicas e assemelhar-se ao contexto em que os biomarcadores serão aplicados. Mais ainda, a heterogeneidade impede a comparação dos resultados dos estudos existentes.

Terceiro, considerando o uso de biomarcadores para a detecção de recidiva, a influência do uso das drogas intra-vesicais tópicas sobre a expressão das proteínas também deveria ser analisada. A ação antineoplásica do BCG se dá por estímulo inflamatório, produzindo uma resposta imunológica local capaz de combater células tumorais. Sabe-se que a intensidade da resposta inflamatória é imprevisível, mesmo que seja aplicada a mesma cepa e quantidade de BCG ⁽⁵⁰⁾. Desta forma, inflamações exuberantes ou duradouras poderiam gerar a expressão aberrante dos biomarcadores. No presente estudo, o nível da PAI-1 estava aumentado em pacientes submetidos à aplicação prévia de BCG intra-vesical, porém este marcador mostrou-se um preditor independente da aplicação de BCG para prever recidivas da doença. Em nosso conhecimento, nenhum estudo sobre a utilização de biomarcadores urinários para

seguimento de câncer de bexiga avaliou se existe influência do uso prévio de BCG intra-vesical nos resultados.

Quarto, um grande número de estudos publicados nessa área utilizou métodos complexos de análise dos biomarcadores, dispendiosos e de difícil reprodução. A análise urinária por ELISA tem as vantagens de ser um método automatizado, de rápida execução, que necessita de apenas um técnico para processar centenas de amostras num único dia. Baseando-se nos custos dos *kits* de ELISA utilizados no presente estudo (R\$ 2.800,00 por proteína para analisar 44 pacientes), o preço de custo de um painel com as quatro proteínas com resultados significantes seria R\$ 255,00, inferior ao preço de uma cistoscopia.

Seria lógico esperar que a PAI-1, que antecipou a ocorrência de recidiva tumoral, aumentasse a sua expressão progressivamente até o surgimento de uma lesão clinicamente detectável. Ao contrário, esta proteína não apresentou nível aumentado em pacientes com carcinoma urotelial na coleta de urina. Uma hipótese para explicar esse fato é que a hiperexpressão da PAI-1 ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral, mas se atenua em fases mais tardias da oncogênese. De maneira oposta, a IL-8 mostrou-se hiperexpressa nas duas situações e seus níveis aumentaram progressivamente. Estas proteínas nunca foram descritas para prever a recidiva futura de câncer de bexiga e, portanto, pouco se sabe sobre a relação da cinética de seus níveis com ocorrência de recidiva tumoral.

O presente estudo apresenta algumas limitações. De forma interessante, a incidência de recidiva de câncer de bexiga na população estudada foi menor do que a reportada na literatura (24% *versus* 70%) ⁽³⁾. O número de pacientes incluídos foi três vezes maior do que o sugerido pelo cálculo amostral, mas mesmo assim o poder

estatístico da análise pode ter sido atenuado pela ocorrência reduzida de eventos (recidiva tumoral). Apesar do seguimento mediano de 47 meses parecer ser suficiente para se analisar os desfechos propostos, diretrizes internacionais recomendam o seguimento mínimo para câncer de bexiga de 5 anos ^(11, 111, 112). Essa diferença também pode ter limitado a detecção de mais recidiva na população. Estudos futuros poderão avaliar se a expressão das proteínas na urina ao longo do tempo relaciona-se com o risco de recidiva tumoral.

Não obstante, a natureza prospectiva do presente estudo, o número de casos incluídos e a homogeneidade da população avaliada tornam os resultados apresentados robustos. Além disso, esta é a primeira vez que a influência do emprego recente de BCG tópico sobre os níveis dos biomarcadores urinários para a monitorizar a recidiva de câncer de bexiga é reportada.

De forma prática, o painel apresentado poderia minimizar o número de cistoscopias desnecessárias se utilizado para estratificar os pacientes com menor risco de recidiva tumoral. Idealizando sua aplicação, um painel com as quatro proteínas com resultados significantes (PAI-1, ApoA-1, MMP-9 e IL-8) seria empregado na urina dos pacientes com carcinoma urotelial superficial de bexiga em seguimento. Nos pacientes com o painel para diagnóstico (ApoA-1, MMP-9 e IL-8) positivo estaria justificada a realização de cistoscopia; nos casos negativos estaria indicada a análise do painel antecipatório (PAI-1 e IL-8). Considerando a alta especificidade do painel antecipatório (86%), indivíduos com o resultado normal poderiam ser submetidos a cistoscopias com menor frequência. Conforme enfatizado previamente, os painéis podem ser aplicados independente da realização prévia de BCG.

Antes do emprego clínico, a próxima fase de investigação implica na validação dos painéis avaliados, em outras coortes, com grande número de participantes. A fim de consolidar a sua aplicação, seria interessante comparar a eficiência dos painéis com os exames de seguimento preconizado atualmente (citologia oncológica, ultrassom e cistoscopia) ^(111, 112). Por último, os painéis poderiam ser utilizados em associação com dados clínicos dos pacientes, com propósito de estratificar os que apresentam maior risco de recidiva.

6. CONCLUSÕES

1. Os níveis urinários de ApoA-1, MMP-9 e IL-8 associaram-se significativamente com a presença de recidiva de carcinoma urotelial de bexiga no momento da coleta de urina. Um painel incluindo as três proteínas apresentou acurácia substancial para diagnosticar a recidiva tumoral.
2. Os níveis urinários de PAI-1 e IL-8 associaram-se significativamente com a recidiva de carcinoma urotelial de bexiga durante o seguimento. Um painel incluindo as duas proteínas apresentou acurácia substancial para prever a recidiva tumoral.
3. Os níveis urinários dos biomarcadores urinários não são influenciados pela aplicação prévia ou em curso de BCG tópico intra-vesical.

7. ANEXO

Anexo A - Tabela para cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do painel dos biomarcadores para o diagnóstico de recidiva.

	Sem recidiva	Recidiva	
Painel negativo	129	10	139
Painel alterado	6	6	12
	135	16	151

Anexo B - Tabela para cálculo de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia do painel dos biomarcadores para prever recidiva durante o seguimento.

	Sem recidiva	Recidiva	
Painel negativo	99	13	112
Painel alterado	15	8	23
	114	21	135

8. REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68:7-30.
2. Incidência do câncer no Brasil 2018. INCA. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Data de acesso: 13/11/2018.
3. Wood Jr DP. Urology. Em Campbell-Walsh: Urology, Ed Elsevier, 2012, pg 2309-34.
4. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2013; 132: 1133-45.
5. Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, et al. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA* 2011; 306: 737-45.
6. Malats N, Real FX. Epidemiology of bladder cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 2015; 29: 177-89.
7. Shariat SF, Sfakianos JP, Droller MJ, Karakiewicz PI, Meryn S, Bochner BH. The effect of age and gender on bladder cancer: a critical review of the literature. *BJU Int* 2010; 105: 300-8.
8. Stimson CJ, Chang SS, Barocas DA, Humphrey JE, Patel SG, Clark PE, Smith JA Jr, Cookson MS. Early and late perioperative outcomes following radical cystectomy: 90-day readmissions, morbidity and mortality in a contemporary series. *J Urol* 2010; 184: 1296-300.
9. Sanchez-Ortiz RF, Huang WC, Mick R, Van Arsdalen KN, Wein AJ, Malkowicz SB. An interval longer than 12 weeks between the diagnosis of muscle invasion and cystectomy is associated with worse outcome in bladder carcinoma. *J Urol* 2003; 169: 110-5.
10. Lee CT, Madii R, Daignault S, Dunn RL, Zhang Y, Montie JE, Wood DP Jr. Cystectomy delay more than 3 months from initial bladder cancer diagnosis results in decreased disease specific and overall survival. *J Urol* 2006; 175: 1262-7.
11. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Roupêt M; European Association of Urology (EAU). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. *Eur Urol* 2011; 59(6):997-1008.

12. Sarosdy MF, Schellhammer P, Bokinsky G, Kahn P, Chao R, Yore L, Zadra J, Burzon D, Osher G, Bridge JA, Anderson S, Johansson SL, Lieber M, Soloway M, Flom K. Clinical evaluation of a multi-target fluorescent in situ hybridization assay for detection of bladder cancer. *J Urol* 2002; 168: 1950-54.
13. Strobe SA, Ye Z, Hollingsworth JM, Hollenbeck BK. Patterns of care for early stage bladder cancer. *Cancer* 2010; 116: 2604-11.
14. Avritscher EBC, Cooksley CD, Grossman HB, Sabichi AL, Hamblin L, Dinney CP, Elting LS. Clinical model of lifetime cost of treating bladder cancer and associated complications. *Urology* 2006; 68: 549-53.
15. Linton KD, Rosario DJ, Thomas F, Rubin N, Goepel JR, Abbod MF, Catto JW. Disease specific mortality in patients with low risk bladder cancer and the impact of cystoscopic surveillance. *J Urol* 2013; 189: 828-33.
16. Xylinas E, Kluth LA, Rieken M, Karakiewicz PI, Lotan Y, Shariat SF. Urine markers for detection and surveillance of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2014; 32: 222-9.
17. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, Babineau D, Ulchaker JC, Liou LS, Brainard JA, Biscotti CV, Jones JS, Tubbs RR. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol* 2007; 127: 295-330.
18. Grossman HB, Soloway M, Messing E, Katz G, Stein B, Kassabian V, Shen Y. Surveillance for recurrent bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2006; 295: 299-305.
19. Grossman HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, Shen Y. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *JAMA* 2005; 293: 810-6.
20. Hajdinjak T. UroVysion FISH test for detecting urothelial cancers: meta-analysis of diagnostic accuracy and comparison with urinary cytology testing. *Urol Oncol* 2008; 26: 646-51.
21. Gofrit ON, Zorn KC, Silvestre J, Shalhav AL, Zagaja GP, Msezane LP, Steinberg GD. The predictive value of multi-targeted fluorescent in-situ hybridization in patients with history of bladder cancer. *Urol Oncol* 2008; 26: 246-9.

22. Mian C, Pycha A, Wiener H, Haitel A, Lodde M, Marberger M. Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *J Urol* 1999; 161: 1486-9.
23. Olsson H, Zackrisson B. ImmunoCyt a useful method in the follow-up protocol for patients with urinary bladder carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2001; 35: 280-2.
24. Vriesema JL, Atsma F, Kiemeney LA, Peelen WP, Witjes JA, Schalken JA. Diagnostic efficacy of the ImmunoCyt test to detect superficial bladder cancer recurrence. *Urology* 2001; 58: 367-71.
25. Pfister C, Chautard D, Devonec M, Perrin P, Chopin D, Rischmann P, Bouchot O, Beurton D, Coulange C, Rambeaud JJ. Immunocyt test improves the diagnostic accuracy of urinary cytology: results of a French multicenter study. *J Urol* 2003; 169: 921-4.
26. Sánchez-Carbayo M, Herrero E, Megías J, Mira A, Soria F. Initial evaluation of the new urinary bladder cancer rapid test in the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 1999; 54: 656-61.
27. Babjuk M, Kostírová M, Mudra K, Pecher S, Smolová H, Pecen L, Ibrahim Z, Dvoráček J, Jarolím L, Novák J, Zima T. Qualitative and quantitative detection of urinary human complement factor H-related protein (BTA stat and BTA TRAK) and fragments of cytokeratins 8, 18 (UBC rapid and UBC IRMA) as markers for transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2002; 41: 34-9.
28. Schroeder GL, Lorenzo-Gomez MF, Hautmann SH, Friedrich MG, Ekici S, Huland H, Lokeshwar V. A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *J Urol* 2004; 172: 1123-6.
29. Li S, Wei X, He J, Tian X, Yuan S, Sun L. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomed Pharmacother*. 2018; 105:83-94.
30. Boccaccio C, Comoglio PM. A functional role for hemostasis in early cancer development, *Cancer Res*. 2005; 65: 8579.
31. Alberti C, Pinciroli P, Valeri B, Ferri R, Ditto A, Umezawa K, Sensi M, Canevari S, Tomassetti A. Ligand-dependent EGFR activation induces the coexpression of IL-6 and PAI-1 via the NFkB pathway in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 2012; 31: 4139-49.
32. Paugh BS, Paugh SW, Bryan L, Kapitonov D, Wilczynska KM, Gopalan SM, Rokita H, Milstien S, Spiegel S, Kordula T. EGF regulates plasminogen activator

inhibitor-1 (PAI-1) by a pathway involving c-Src, PKCdelta, and sphingosine kinase 1 in glioblastoma cells. *FASEB J.* 2008; 22: 455.

33. Wyrzykowska P, Stalińska K, Wawro M, Kochan J, Kasza A. Epidermal growth factor regulates PAI-1 expression via activation of the transcription factor Elk-1. *BBA - Gene Regul Mech.* 2010; 1799: 616-21.

34. Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Hidalgo CH, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Dijke PT. Specific interactions between smad proteins and AP-1 components determine TGFβ-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene.* 2013; 32: 3606-15.

35. Spence MJ, Streiff R, Day D, Ma Y. Oncostatin M induces tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in Calu-1 lung carcinoma cells. *Cytokine.* 2002; 18: 26.

36. Oh JW, Olman M, Benveniste EN. CXCL12-mediated induction of plasminogen activator inhibitor-1 expression in human CXCR4 positive astroglioma cells. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 573-7.

37. Trân-Thang C, Kruithof E, Lahm H, Schuster WA, Tada M, Sordat B. Modulation of the plasminogen activation system by inflammatory cytokines in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer.* 1996; 74: 846.

38. Arndt A, Murphy P, Hart DA. Human HuH-7 hepatoma cells express urokinase and plasminogen activator inhibitor-1: identification, characterization and regulation by inflammatory mediators. *BBA- Mol Basis Dis.* 1992; 138:149-56.

39. Strong AL, Ohlstein JF, Biagas BA, Rhodes LV, Pei DT, Tucker HA, Llamas C, Bowles AC, Dutreil MF, Zhang S. Leptin produced by obese adipose stromal/stem cells enhances proliferation and metastasis of estrogen receptor positive breast cancers. *Breast Cancer Res.* 2015; 17: 112.

40. Götte M, Mohr C, Koo CY, Stock C, Vaske AK, Viola M, Ibrahim SA, Peddibhotla S, Teng YH, Low JY. miR-145-dependent targeting of junctional adhesion molecule a and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene.* 2010; 29: 6569-80.

41. Villadsen SB, Bramsen JB, Ostensfeld MS, Wiklund ED, Fristrup N, Gao S, Hansen TB, Jensen TI, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjøl L, Kjems J. The miR-143/-145 cluster regulates plasminogen activator inhibitor-1 in bladder cancer. *Brit J Cancer.* 2012; 106: 366-74.

42. Zhu ED, Li N, Li BS, Li W, Zhang WJ, Mao XH, Guo G, Zou QM, Xiao B. miR-30b, down-regulated in gastric cancer, promotes apoptosis and suppresses tumor growth by targeting plasminogen activator inhibitor-1. *PLoS One*. 2014; 9: e106049.
43. Pavón MA, Arroyosolera I, Téllezgabriel M, León X, Virós D, López M, Gallardo A, Céspedes MV, Casanova I, Lópezpousa A. Enhanced cell migration and apoptosis resistance may underlie the association between high SERPINE1 expression and poor outcome in head and neck carcinoma patients, *Oncotarget*. 2015; 6: 29016-33.
44. Isogai C, Laug WE, Shimada H, Declerck PJ, Stins MF, Durden DL, Erdreichstein A, Declerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res*. 2001; 61: 5587-94.
45. Bajou K, Peng H, Laug WE, Maillard C, Noel A, Foidart JM, Martial JA, Declerck YA. Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis, *Cancer Cell*. 2008; 14: 324-34.
46. Herszényi L, Plebani M, Cardin R, Carraro P, De PM, Roveroni G, Naccarato R, Farinati F. The role of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in gastric cancer. *Acta Physiol Hung*. 1995; 83: 213-21.
47. Satsuki M, Kazuyuki K, Masafumi T, Atsuhiko I, Takashi D, Toshinori U, Masumi I, Shogo S, Satoru N, Toshio M. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 is a potential therapeutic strategy in ovarian cancer, *Cancer Biol Ther*. 2015; 16: 253-60.
48. Giacoia EG, Miyake M, Lawton A, Goodison S, Rosser, CJ. PAI-1 leads to G1-phase cell cycle progression through cyclin D3/CDK4/6 up-regulation, *Mol Cancer Res*. 2014; 12: 322.
49. Chan OTM, Furuya H, Pagano I, Shimizu Y, Hokutan K, Dyrskjöt L, Jensen JB, Malmstrom PU, Segersten U, Janku F, Rosser CJ. Association of MMP-2, RB and PAI-1 with decreased recurrence free survival and overall survival in bladder cancer patients. *Oncotarget*. 2017; 8: 99707-21.
50. Becker M, Szarvas T, Wittschier M, vom Dorp F, Totsch M, SchmidKW, Rubben H, Ergun S. Prognostic impact of plasminogen activator inhibitor type 1 expression in bladder cancer. *Cancer*. 2010; 116: 4502-12.

51. Urquidi V, Kim J, Chang M, Dai Y, Rosser CJ, Goodison S. CCL18 in a multiplex urine-based assay for the detection of bladder cancer. *PLoS One*. 2012; 7: e37797.
52. Mitsumoto A, Nakagawa Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res*. 2001; 35: 885-93.
53. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 9103-8.
54. Vasseur S, Afzal S, Tardivel-Lacombe J, Park DS, Iovanna JL, Mak TW. DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 1111-6.
55. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006; 441: 437-43.
56. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. 2005; 7: 263-73.
57. Lin Y, Chen Q, Liu QX, Zhou D, Lu X, Deng XF, Yang H, Zheng H, Qiu Y. High expression of DJ-1 promotes growth and invasion via the PTEN-AKT pathway and predicts a poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Med*. 2018; 7: 809-19.
58. Davidson B, Hadar R, Schlossberg A, Sternlicht T, Slipicevic A, Skrede M, Risberg B, Flørenes VA, Kopolovic J, Reich R. Expression and clinical role of DJ-1, a negative regulator of PTEN, in ovarian carcinoma. *Hum Pathol*. 2008; 39: 87-95.
59. Lee H, Choi SK, Ro JY. Overexpression of DJ-1 and HSP90alpha, and loss of PTEN associated with invasive urothelial carcinoma of urinary bladder: Possible prognostic markers. *Oncol Lett*. 2012; 3: 507-12.
60. Kumar P, Nandi S, Tan TZ, Ler SG, Chia KS, Lim WY, Bütow Z, Vordos D, De la Taille A, Al-Haddawi M, Raida M, Beyer B, Ricci E, Colombel M, Chong TW, Chiong E, Soo R, Park MK, Ha HK, Gunaratne J, Thiery JP. Highly sensitive and specific novel biomarkers for the diagnosis of transitional bladder carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6: 13539-49.
61. Zamanian-Daryoush M, Di Donato JA. Apolipoprotein A-I and Cancer. *Front Pharmacol*. 2015; 6: 265.

62. Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, Schatzkin A, Hayes RB, Virtamo J, Albanes D. Prediagnostic total and high-density lipoprotein cholesterol and risk of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18: 2814-21.
63. Jafri H, Alsheikh-Al AA, and Karas RH. Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55: 2846-54.
64. Tuft Stavnes H, Nymoene DAH, Falkenthal TE, Kaern J, Trope, CG, Davidson B. APOA1 mRNA expression in ovarian serous carcinoma effusions is a marker of longer survival. *Am J Clin Pathol.* 2014; 142: 51-7.
65. Chang SJ, Hou MF, Tsai SM, Wu SH, Hou LA, Ma H, Shann TY, Wu SH, Tsai LY. The association between lipid profiles and breast cancer among Taiwanese women. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 1219-23.
66. Ehmann M, Felix K, Hartmann D, Schnolzer M, Nees M, Vorderwulbecke S, et al. Identification of potential markers for the detection of pancreatic cancer through comparative serum protein expression profiling. *Pancreas.* 2007; 34: 205-14.
67. Zamanian-Daryoush M, Lindner D, Tallant TC, Wang Z, Buffa J, Klipfell E, Parker Y, Hatala D, Parsons-Wingerter P, Rayman P, Yusufishaq MS, Fisher EA, Smith JD, Finke J, DiDonato JA, Hazen SL. The cardio protective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects. *J Biol Chem.* 2013; 288: 21237–52.
68. Colombo MP, Mantovani A. Targeting myelo monocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion. *Cancer Res.* 2005; 65: 9113–6.
69. De Nardo D, Labzin LI, Kono H, Seki R, Schmidt SV, Beyer M, Xu D, Zimmer S, Lahrmann C, Schildberg FA, Vogelhuber J, Kraut M, Ulas T, Kerksiek A, Krebs W, Bode N, Grebe A, Fitzgerald ML, Hernandez NJ, Williams BR, Knolle P, Kneilling M, Röcken M, Lütjohann D, Wright SD, Schultze JL, Latz E. High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nat Immunol.* 2014; 15: 152-60.
70. Zamanian-Daryoush M, Di Donato JA. Apolipoprotein A-I and cancer. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 265.
71. Peng M, Zhang Q, Cheng Y, Fu S, Yang H, Guo X, Zhang J, Wang L, Zhang L, Xue Z, Li Y, Da Y, Yao Z, Qiao L, Zhang R. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F

suppresses tumor-associated macrophages and pancreatic cancer progression. *Oncotarget*. 2017; 8: 99693-706.

72. Aljabery F, Olsson H, Gimm O, Jahnson S, Shabo I. M2-macrophage infiltration and macrophage traits of tumor cells in urinary bladder cancer. *Urol Oncol*. 2018; 36: 159: e19-e26.

73. Shang Z, Wang J, Wang X, Yan H, Cui B, Jia C, Wang Q, Cui X, Li J, Ou T. Preoperative serum apolipoprotein A-I levels predict long-term survival in non-muscle-invasive bladder cancer patients. *Cancer Manag Res*. 2018; 10: 1177-90.

74. Lei T, Zhao X, Jin S, Meng Q, Zhou H, Zhang M. Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis. *Clin Genitourin Cancer*. 2013;11: 56–62.

75. Li C, Li H, Zhang T, Li J, Liu L, Chang J. Discovery of Apo-A1 as a potential bladder cancer biomarker by urine proteomics and analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 446:1047-52.

76. Chen CL, Lin TS, Tsai CH, Wu CC, Chung T, Chien KY, Wu M, Chang YS, Yu JS, Chen YT. Identification of potential bladder cancer markers in urine by abundant-protein depletion coupled with quantitative proteomics. *J Proteomics*. 2013; 85: 28-43.

77. Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP9 Biosensors: Recent Advances Sensors (Basel). 2018;18.

78. Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013; 48: 222-72

79. Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781-92.

80. Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 667-71.

81. Liotta, L. A., S. Abe, Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 2268-72.

82. Chen J, Liu X, Jiao H, Peng L, Huo Z, Yang W, Shen Q, Li T, Liu Q. Prognostic and clinical significance of STAT3 and MMP9 in patients with gastric cancer: a meta-analysis of a Chinese cohort. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8: 546-57.

83. Baldwin RM, Haghandish N, Daneshmand M, Amin S, Paris G, Falls TJ, Bell JC, Islam S, Côté J. Protein arginine methyltransferase 7 promotes breast cancer cell invasion through the induction of MMP9 expression. *Oncotarget*. 2015; 6: 3013-32.
84. Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol* 1996; 149: 273-82.
85. Ramón de Fata F, Ferruelo A, Andrés G, Gimbernat H, Sánchez-Chapado M, Angulo JC. The role of matrix metalloproteinase MMP-9 and TIMP-2 tissue inhibitor of metalloproteinases as serum markers of bladder cancer. *Actas Urol Esp*. 2013; 37: 480-8.
86. Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, Crippa A, Moura CM, Adonias SP, Srougi M, Dall'Oglio MF. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urol*. 2012; 13: 12-8.
87. Nutt JE, Durkan GC, Mellon JK, Lunec J. Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: the induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine. *BJU Int*. 2003; 91: 99-104.
88. Masuda N, Ogawa O, Park M, Liu AY, Goodison S, Dai Y, Kozai L, Furuya H, Lotan Y, Rosser CJ, Kobayashi T. Meta-analysis of a 10-plex urine-based biomarker assay for the detection of bladder cancer. *Oncotarget*. 2018; 9: 7101-11.
89. Waugh DJJ, Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6735-41.
90. Cheng GZ, Park S, Shu S, He L, Kong W, Zhang W, Yuan Z, Wang LH, Cheng JQ. Advances of AKT pathway in human oncogenesis and as a target for anti-cancer drug discovery. *Curr Cancer DrugTargets*. 2008; 8: 2-6.
91. MacManus CF, Pettigrew J, Seaton A, Wilson C, Maxwell PJ, Berlingeri S, Purcell C, McGurk M, Johnston PG, Waugh DJ. Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgen-independent prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2007; 5: 737-48.
92. Venkatakrisnan G, Salgia R, Groopman JE. Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells. *J Biol Chem*. 2000; 275: 6868-75.

93. Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS. Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. *Lung Cancer*. 2007; 56: 25-33.
94. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003; 170: 3369-76.
95. Takamori H, Oades ZG, Hoch OC, Burger M, Schraufstatter IU. Autocrine growth effect of IL-8 and GRO α on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1. *Pancreas*. 2000; 21: 52-6.
96. Brew R, Erikson JS, West DC, Kinsella AR, Slavin J, Christmas SE. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine*. 2000; 12: 78-85.
97. Kamohara H, Takahashi M, Ishiko T, Ogawa M, Baba H. Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor- α and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. *Int J Oncol*. 2007; 31: 627-32.
98. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*. 2003; 170: 3369-76.
99. Petreaca ML, Yao M, Lui Y, Defea K, Martins-Green M. Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 5014-23.
100. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, Gudas JM, Bar-Eli M. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 2002; 161: 125-34.
101. Shi Q, Abbruzzese JL, Huang S, Fidler IJ, Xiong Q, Xie K. Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 3711-21.
102. Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, Radinsky R, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res*. 2000; 60: 2290-9.

103. Karashima T, Sweeney P, Kamat A, Huang S, Kim SJ, Bar-Eli M, McConkey DJ, Dinney CP. Nuclear factor- κ B mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 2786-97.
104. Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, Gudas JM, McConkey DJ, Bar-Eli M. Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor- κ B. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 3167-75.
105. Inoue K, Slaton JW, Eve BY, Slaton JW, Eve BY, Kim SJ, Perrotte P, Balbay MD, Yano S, Bar-Eli M, Radinsky R, Pettaway CA, Dinney CP. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2104-19.
106. Urquidí V, Chang M, Dai Y, Kim J, Wolfson ED, Goodison S, Rosser CJ. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *BMC Urol.* 2012; 12: 12.
107. Rosser CJ, Ross S, Chang M, Dai Y, Mengual L, Zhang G, Kim J, Urquidí V, Alcaraz A, Goodison S. Multiplex protein signature for the detection of bladder cancer in voided urine samples. *J Urol.* 2013; 190: 2257-62.
108. Frantzi M, van Kessel KE, Zwarthoff EC, Marquez M, Rava M, Malats N, Merseburger AS, Katafigiotis I, Stravodimos K, Mullen W, Zoidakis J, Makridakis M, Pejchinovski M, Critselis E, Lichtinghagen R, Brand K, Dakna M, Roubelakis MG, Theodorescu D, Vlahou A, Mischak H, Anagnostou NP. Development and Validation of Urine-based Peptide Biomarker Panels for Detecting Bladder Cancer in a Multi-center Study. *Clin Cancer Res.* 2016; 22: 4077-86.
109. Soukup V, Kalousová M, Capoun O, Sobotka R, Breyt Z, Pešl M, Zima T, Hanuš T. Panel of Urinary Diagnostic Markers for Non Invasive Detection of Primary and Recurrent Urothelial Urinary Bladder Carcinoma. *Urol Int.* 2015; 95: 56-64.
110. Boehm BE, Cornell JE, Wang H, Mukherjee N, Oppenheimer JS, Svatek RS. Efficacy of bacillus Calmette-Guérin Strains for Treatment of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Urol.* 2017; 198: 503-10.
111. American Urological Association Guidelines – Non-muscle invasive bladder cancer. [https://www.auanet.org/guidelines/bladder-cancer-non-muscle-invasive-\(2016\)](https://www.auanet.org/guidelines/bladder-cancer-non-muscle-invasive-(2016)) -

data de acesso 12/11/2018.

112. National Comprehensive Cancer Network – Bladder Cancer guidelines.
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/bladder.pdf - data de acesso:
12/11/2018.