

LUÍS FELIPE PIOVESAN

**Análise da expressão das metaloproteinases 2
e 9 e seus reguladores no câncer de bexiga**

São Paulo

2011

LUÍS FELIPE PIOVESAN

Análise da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e seus reguladores no câncer 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. Marcos Francisco Dall’Oglio

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Piovesan, Luís Felipe

Análise da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e seus reguladores no câncer de bexiga / Luís Felipe Piovesan. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Marcos Francisco Dall'Oglio.

Descritores: 1.Neoplasias da bexiga urinária 2.Prognóstico 3.Expressão gênica
4.Metaloproteinase 2 da matriz 5.Metaloproteinase 9 da matriz

USP/FM/DBD-331/11

Dedicatória

Aos meus pais, "Dr." Luiz Valdir e "Dra." Regina Isabel, exemplos de vida. Vocês são os verdadeiros doutores!

A minha esposa Juliana, pelo suporte, compreensão, paciência e amor.

As minhas irmãs Fabi e Rê, cunhados e sobrinhos, pelo amor incondicional.

Aos meus sogros e ao Lui, pelo carinho.

Agradecimentos

A todos profissionais que fazem da USP uma instituição de referência além de nossas fronteiras. À FMUSP e ao HCFMUSP, pelo seu destacado papel de inovação e qualidade no ensino, pesquisa e assistência, locais onde muito aprendi e fiz amigos para toda vida.

Ao Professor Dr. Miguel Srougi, pelo seu espírito de liderança e fomentador de oportunidades. Ao Professor Dr. Homero Bruschini, pela condução brilhante dos rumos da Pós-Graduação.

Ao Professor Dr. Marcos Francisco Dall’Oglio, pela oportunidade, amizade e caráter. À Professora Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, pelo suporte.

À Dra. Sabrina Thalita dos Reis e a todos colaboradores do LIM 55, pela ajuda inestimável. À Sra. Elisa de Arruda Cruz da Silva, por toda ajuda e compreensão. A todos colaboradores, pela presteza de sempre.

Aos colegas e mestres, que compartilharam caminhos, em especial ao colega, amigo e exemplo de caráter Aguinel. Aos companheiros de trabalho da UROMED. Ao João e a Winnie, pelo carinhoso amparo. Aos amigos, sempre compreensivos.

E, final e destacadamente, à minha família, pela educação, carinho e paciência.

Esta tese foi escrita e compilada em L^AT_EX e está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço 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. 2^a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de símbolos e abreviações

Resumo

Summary

Introdução	p. 1
1.1 Carcinoma urotelial de bexiga	p. 1
1.2 Biologia do câncer	p. 5
Objetivos	p. 17
2.1 Objetivo primário	p. 17
2.2 Objetivo secundário	p. 17
Material e método	p. 18
3.1 Pacientes	p. 18
3.2 Ética	p. 18
3.3 Processamento da amostra	p. 19
3.3.1 Extração de RNA	p. 19
3.3.2 Síntese de cDNA	p. 20
3.3.3 qRT-PCR	p. 20
3.4 Análise estatística	p. 22

Resultados	p. 24
Discussão	p. 29
Conclusões	p. 42
Anexo A	p. 43
AJCC TNM – 2004	p. 43
Avaliação do tumor primário (T)	p. 43
Avaliação dos linfonodos (N)	p. 44
Avaliação das metástases a distância (M)	p. 44
Anexo B	p. 45
Metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus substratos	p. 45
Anexo C	p. 47
Dados anatomo-patológicos e expressão dos genes estudados	p. 47
Referências	p. 49

Lista de Tabelas

1	<i>Primers</i> utilizados para a quantificação da expressão dos genes MMP-2 e MMP-9 e seus reguladores no CUB.	p. 21
2	Expressão dos 8 genes de acordo com o grau histológico, estadiamento patológico e invasão angiolinfática	p. 28

Lista de Figuras

1	Graduação histológica do carcinoma urotelial de bexiga	p. 2
2	Genes envolvidos nas vias de indução e inibição dos genes da MMP-2 e MMP-9	p. 16
3	Sistema TaqMan®	p. 22
4	Perfil de expressão dos 8 genes em 40 pacientes com CUB	p. 27

Lista de Símbolos e Abreviações

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

B2M: Beta 2 Microglobulina

BCG: *Bacillus Calmette-Guérin*

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CUB: Carcinoma urotelial de bexiga

EMMPRIN: *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*

EORTC: *European Organization for Research and Treatment of Cancer*

EUA: Estados Unidos da América

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São

Paulo

HPB: Hiperplasia prostática benigna

IAL: Invasão angiolinfática

IHQ: Estudo imuno-histoquímico

IL-8: Interleucina 8

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LIM 55: Laboratório de Investigações Médicas 55

M-VAC: Metotrexate, Vimblastina, Doxorrubicina e Cisplatina

MB: Membrana basal

MEC: Matriz extracelular

MMP: Metaloproteinase da matriz

MT1-MMP: Metaloproteinase da matriz tipo membrana 1

PKC: Proteína quinase C

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RECK: *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs*

RNA: Ácido Ribonucleico

RNAm: Ácido Ribonucleico mensageiro

RTU: Ressecção transuretral

TGF- β : Fator de crescimento transformante beta

TIMP: Inibidor tecidual de Metaloproteinase

Resumo

Piovesan LF. Análise da expressão das metaloproteinases 2 e 9 e seus reguladores no câncer de bexiga [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introdução: O Carcinoma Urotelial de Bexiga (CUB) é o segundo tumor urológico mais prevalente no Brasil. Devido ao elevado custo no processo que envolve seu diagnóstico, tratamento e seguimento, o CUB é um dos tipos de tumores mais caros para os sistemas de saúde. Embora existam fatores prognósticos definidos, como o estadiamento patológico, a diferenciação histológica e a presença de invasão angiolinfática (IAL), os mesmos demonstram-se insuficientes para uma acurada definição de comportamento da doença. Com a evolução da pesquisa molecular, um grande número de potenciais novos marcadores de agressividade tem surgido. As metaloproteinases da matriz (MMP) são proteínas teciduais, pertencentes à família das endoproteinases, que degradam vários componentes da matriz extracelular. A expressão de diversas MMPs, especialmente MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), bem como seus ativadores e inibidores, tem sido estudada como potencial marcador de comportamento tumoral em várias neoplasias. **Objetivos:** Avaliarmos os níveis de expressão dos genes das gelatinases MMP-2 e MMP-9 no CUB, assim como proteínas envolvidas em suas vias de ativação e inibição (MMP-14, IL-8, TIMP-1, TIMP-2, RECK e TGF- β). **Material e Método:** Estudamos pela técnica de qRT-PCR a expressão dos 8 genes em amostras de CUB de 40 pacientes submetidos a RTUB, tendo como grupo controle amostras de urotélio sem câncer de 6 pacientes submetidos a prostatectomia aberta por HPB, bem como sua relação com marcadores prognósticos clássicos (estágio, grau e IAL). **Resultados:** Houve uma superexpressão de MMP-9 na maioria das amostras de CUB, bem como subexpressão de MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, MMP-14, IL-8, TGF- β e RECK. Comparando os níveis de expressão dos genes com o estágio patológico, houve uma superexpressão de MMP-9 nos tumores pT1-2, quando comparados com pTa ($p=0,026$), bem como maior expressão de IL-8 nos tumores pT1 e pT2 ($p=0,015$ e $p=0,048$, respectivamente). Embora estatisticamente não significativa, houve uma superexpressão de MMP-14 nos tumores pT2, quando comparados aos demais ($p=0,087$). Com relação ao grau histológico, também identificamos superexpressão de MMP-9 nos tumores de alto grau, quando comparados aos de baixo grau ($p=0,012$), assim como maior expressão de IL-8 nos tumores de alto grau ($p=0,003$). **Conclusão:** Houve uma superexpressão de MMP-9 e uma subexpressão de MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, MMP-14, RECK, IL-8 e TGF- β no CUB, quando comparado com o grupo controle. Também identificamos uma superexpressão de MMP-9 e IL-8 em tumores pT1-2 quando comparados com pTa e de alto grau quando comparados com baixo grau. A subexpressão dos principais inibidores da MMP-9 (TIMP-1 e RECK) pode explicar sua superexpressão no CUB,

assim como a superexpressão de IL-8 nos tumores invasivos e de alto grau pode agir como fator ativador da MMP-9 nestes mesmos tumores.

Descritores: bexiga, câncer de bexiga, prognóstico, expressão gênica, metaloproteínases, MMP-2, MMP-9

Summary

Piovesan LF. Expression of metalloproteinases 2 and 9 and their regulator genes in bladder cancer [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Introduction: Bladder cancer (BC) is the second most common urological tumor in Brazil. Because its high cost on diagnosis, treatment and follow-up, BC is one of the most expensive malignancies for health care providers. Although we have well-known prognostic factors, like pathological stage, histologic grade and lymphovascular invasion, they are insufficient to figure more accurate tumor aggressiveness. Recent molecular biology helped us to discover a huge amount of potential markers. Matrix metalloproteinases (MMP) are tissue endopeptidases that degrade components of extracellular matrix. Expression of several MMP, specially MMP-2 and MMP-9 (gelatinases), and their activators and inhibitors, are investigated as potential behavior markers in many neoplasms. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate expression levels of gelatinases MMP-2 and MMP-9 genes by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in BC, as well as other proteins evolved in the activation and inhibition pathways (MMP-14, IL-8, TIMP-1, TIMP-2, RECK e TGF- β). **Material and Method:** Present study analyzed tissue expression of 8 genes in BC samples of transurethral resection of 40 patients by qRT-PCR, as well as their relation with current prognostic factors (stage, grade and LVI). The control group was composed of urothelial tissue from 6 patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) treated surgically with retropubic prostatectomy. **Results:** In the tumor samples, MMP-9 presented an overexpression and MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, MMP-14, RECK, IL-8, and TGF- β were underexpressed in BC tissue compared to control. Comparing gene level expression to pathologic stage, there was MMP-9 overexpression in pT1-2 tumors compared to pTa ($p=0.026$), as well as IL-8 overexpression in pT1 and pT2 tumors ($p=0.015$ e $p=0.048$, respectively). Although not statistically significant, there was MMP-14 overexpression in pT2 tumors in comparison to pTa-1 ($p=0.087$). About grade, there was MMP-9 overexpression in high-grade tumors compared to low-grade ($p=0.012$), as well as IL-8 overexpression in high-grade tumors ($p=0.003$). There was not relation of any gene expression to LVI. **Conclusions:** We found overexpression of MMP-9 and underexpression of MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, MMP-14, RECK, TGF- β and IL-8 in BC compared with the control group. According to the prognostic factors we found increased levels of MMP-9 and IL-8 gene expression in pT1-2 compared to pTa tumors and high-grade compared to low-grade tumors. Underexpression of major MMP-9 inhibitors (TIMP-1 and RECK) could explain MMP-9 overexpression in BC, as well as IL-8 overexpression in high-grade and stage tumors could act as activation factor of MMP-9 in these tumors.

Descriptors: bladder, bladder cancer, prognosis, gene expression, metalloproteinases, MMP-2, MMP-9

1 Introdução

1.1 Carcinoma urotelial de bexiga

O câncer de bexiga ainda é, atualmente, um problema de saúde pública em escala global. O carcinoma urotelial de bexiga (CUB) é a segunda neoplasia maligna mais comum do trato genitourinário e a segunda causa mais comum de óbito entre os tumores genitourinários^{1,2}. Representa a 4^a neoplasia mais comum em homens e o 5^o tumor mais diagnosticado³, com 70.530 novos casos e 14.680 óbitos estimados para 2010². Na atualidade, há mais de meio milhão de pacientes com o diagnóstico de CUB nos EUA^{4,5}. No Brasil, o CUB representa 3% do total de carcinomas existentes na população, apresentando a segunda maior incidência de tumores urológicos, logo após o câncer de próstata⁶. Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), estima-se para a cidade de São Paulo uma incidência de 13,27 casos para cada 100.000 habitantes, para os anos de 2000 a 2005⁷.

As taxas de incidência e mortalidade variam de acordo com a região geográfica, etnia, gênero e idade. Os dados atuais demonstram que populações brancas possuem uma incidência maior da doença que populações negras, porém, as taxas de mortalidade são praticamente as mesmas. Países industrializados e ambientes urbanos têm uma maior incidência que países em desenvolvimento e ambientes rurais^{4,5}. De acordo com um estudo global de 2002, aproximadamente 63% dos 357.000 novos casos de câncer de bexiga foram relatados em populações ocidentais, configurando-se como o

9º tumor mais frequente, com aproximadamente 145.000 casos de óbito anual (13ª causa de óbito por neoplasias). O câncer de bexiga é uma doença que tipicamente afeta indivíduos idosos, com uma idade mediana de 65-70 anos ao diagnóstico, sendo 3-4 vezes mais comum em homens⁸.

O tabagismo constitui um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia – cerca de 50 a 60% dos pacientes com CUB apresentam este antecedente (dados da população mundial). Outros importantes fatores de risco são a infestação pelo parasita *Schistossoma haematobium*⁹ e a exposição a substâncias químicas como derivados de benzeno e aminas aromáticas, borrachas, couros e outros produtos químicos¹⁰.

O sintoma mais comum do CUB é a hematúria, sendo em sua maior parte esporádica e indolor¹¹. O diagnóstico é feito através de cistoscopia, citologia urinária e biópsia de lesão vesical¹². A cistoscopia e a citologia são consideradas padrão ouro para o diagnóstico do câncer. A citologia, entretanto, possui uma baixa sensibilidade (38 a 48%), embora a especificidade seja de até 98,3%¹³.

O tipo histológico mais comum dos tumores de bexiga é o carcinoma urotelial (95% dos casos), que é classificado em papiloma, neoplasia urotelial de baixo potencial de malignidade e carcinoma urotelial papilífero de baixo e alto grau^{14,15} (figura 1).

G - Graduação Histopatológica			
UICC/AJCC		WHO, 1973	WHO/ISUP, 1998 Consensus WHO, 2004
		Papiloma	Papiloma
GX	O grau de diferenciação não pode ser avaliado		
G1	Bem diferenciado	GI	Neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial de malignidade Carcinoma urotelial de baixo grau
G2	Moderadamente diferenciado	GII	Carcinoma urotelial de alto grau
G3-4	Pouco diferenciado / Indiferenciado	GIII Ca <i>in situ</i>	Neoplasia intraurotelial de alto grau

Figura 1: Graduação histológica do carcinoma urotelial de bexiga

O CUB representa um grupo heterogêneo de tumores, que inclui tumores papilares limitados à mucosa, tumores de alto grau e planos confinados ao epitélio, tumores infiltrativos da lâmina própria ou submucosa e tumores invasivos da muscular própria ou além, sendo o estadiamento segundo a AJCC TNM – 2004 (Anexo A)^{16,17}. Estima-se que até 70-80% dos novos casos se apresentem como doença não-músculo invasiva¹⁸.

O prognóstico depende basicamente do estádio e do grau tumoral^{19,20}. A doença não-músculo invasiva de baixo risco inclui tumores pTa (papilar confinada ao urotélio) e baixo grau, com risco de recorrência de 50-75% e de progressão de 2-5%. A doença não-músculo invasiva de alto risco inclui tumores pT1 (papilar invasivo da lâmina própria), pTis (carcinoma *in situ*) e alto grau, com risco de recorrência de 75% e de progressão de 30-50%¹⁸. Somente 25% de todos os casos apresentam-se inicialmente como tumores músculo-invasivos e a doença primária metastática é infrequente. Entretanto, a sobrevida câncer-específica em 5 anos para os tumores músculo-invasivos não é maior que 65%².

O tratamento inicial para o CUB é a ressecção transuretral (RTU). A RTU é usada para remoção do tumor e obtenção de amostra que servirá para graduação e estadiamento²¹. Para a doença não músculo-invasiva, como tratamento adjuvante de primeira linha, indica-se a terapia intravesical envolvendo administração de medicação (imuno-terapia com BCG [*Bacillus Calmette-Guérin*] e quimioterapia com Mitomicina C), que colabora no melhor controle da doença, prevenindo a recidiva²². Para o CUB invasivo, a terapia mais comum é a cistectomia radical²³.

Entretanto, não é somente a incidência e mortalidade relacionadas ao CUB que o torna tão preocupante, mas também pela sua crescente prevalência e consequente aumento de custos associado ao seu diagnóstico, tratamento e acompanhamento, ao desgaste físico e emocional associados à morbidade (que acompanham as várias formas de apresentação desta enfermidade), além dos custos financeiros pessoais e sociais crescentes. Apesar do prognóstico limitado para os pacientes portadores de tumores

músculo-invasivos e metastáticos, o custo de seu tratamento torna-se muito elevado devido a necessidade de tratamentos cirúrgicos (cistectomia radical) e sistêmicos (quimioterapia) complexos^{24,25}.

Mesmo nos EUA, apesar de elevada prevalência e custo da doença, várias barreiras limitam o progresso no manejo do CUB, dentre eles a falta de sensibilização pública, fundos de pesquisa insuficientes e redução das pesquisas nesta área. Embora exista um considerável debate público sobre a relação entre o tabagismo e o câncer de pulmão, grande parte da população ignora a associação entre o fumo e o CUB^{26,27}, assim como desconhece a hematúria como o sintoma mais importante da presença da doença²⁸⁻³⁰.

Ainda que tenha havido melhora nas estratégias cirúrgicas e quimioterápicas para a doença de alto risco, a sobrevida da doença músculo-invasiva e metastática não apresentou significativa melhora nas últimas décadas. Avanços substanciais na pesquisa do CUB são infreqüentes. Não é surpreendente que pouco se tenha progredido no tratamento da doença não músculo-invasiva desde a introdução do BCG, na década de 70³¹, e no tratamento da doença avançada desde a poliquimioterapia com Metotrexate, Vimblastina, Doxorrubicina e Cisplatina (M-VAC), usada pela primeira vez na década de 80³².

Vários fatores prognósticos estão associados com a progressão do CUB, como a profundidade da invasão (estádio patológico), grau celular e multiplicidade^{19,20}. Atualmente, tabelas de risco e nomogramas, a exemplo da tabela de predição de recorrência e progressão desenvolvida pela EORTC (*European Organization for Research and Treatment of Cancer*), que utiliza dados tanto clínicos quanto anatomo-patológicos como número de lesões, tamanho das lesões, presença de recorrência prévia, estadiamento patológico, grau histológico e presença de carcinoma *in situ*, são as ferramentas mais úteis para escolhas terapêuticas e programação de seguimento dos pacientes com CUB, embora ainda pouco acuradas³³.

Assim sendo, tem-se criado a necessidade pela busca de melhores indicadores prognósticos. Desta forma, novos marcadores moleculares apresentam-se como potenciais candidatos a melhorar a acurácia diagnóstica e prognóstica.

Dentre os marcadores moleculares prognósticos destacamos o p53, gene supressor tumoral, indispensável na manutenção da integridade do genoma. A forma mutante do p53 é encontrada em metade dos carcinomas uroteliais e tem importância prognóstica tanto nos tumores superficiais quanto invasivos³⁴⁻³⁶. O p21 é um outro gene considerado marcador prognóstico e sua expressão é controlada pelo p53. A perda da expressão do p21 também está associada com progressão do carcinoma urotelial³⁷. O produto do gene retinoblastoma (Rb) está envolvido no controle do ciclo celular, senescência e apoptose, mecanismos estes diretamente envolvidos na tumorigênese epitelial, particularmente na bexiga. Nas células tumorais, este gene encontra-se ausente, podendo o ciclo celular progredir sem interrupções³⁸. O CD44 é uma molécula presente na superfície celular, que possui importante papel no processo de metastatização. Está envolvido na interação célula-célula e célula-matriz extracelular³⁹. A perda progressiva da expressão do gene CD44 está associada com a progressão e o alto grau histológico do CUB⁴⁰. Entretanto, todos estes marcadores apresentam utilidade clínica prática ainda bastante limitada.

1.2 Biologia do câncer

Na busca por se conhecer melhor a história natural do câncer, tenta-se observá-lo como um processo mais global, descobrindo-se um grande número de parâmetros biológicos envolvidos, com interesse especial para a ação das enzimas proteolíticas produzidas pelas células tumorais, pelo estroma peritumoral ou pelo endotélio vascular adjacente, uma vez que tem papel central na capacidade de invasão tumoral e metástase⁴¹. Para tanto, é de especial relevância tentarmos compreender a ação de tais

agentes para prevermos o comportamento de um tumor e, futuramente, interferirmos de maneira terapêutica.

A matriz extracelular (MEC) é a primeira barreira a ser ultrapassada pelo câncer para iniciar o processo de metástase. Primeiramente, a célula tumoral ultrapassa a membrana basal (MB) para posteriormente invadir o estroma adjacente, para então penetrar nos vasos sanguíneos e linfáticos e extravasar para órgãos distantes para se proliferar como um novo tumor. Para isso, três passos principais devem ocorrer, fazendo com que as células tumorais adquiram fenótipo metastático: perda da adesão célula-célula e célula-matriz, modulação da MEC (proteólise e adesão) e indução da angiogênese nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral⁴².

A MEC é um denso emaranhado de colágeno e elastina mergulhado numa base viscoelástica de proteoglicanos e glicoproteínas. Já a membrana basal é uma malha (flexível e insolúvel) de colágeno tipo IV e glicoproteínas, como a laminina, a qual desempenha um papel crucial durante a progressão e disseminação de tumores epiteliais, tornando-se permeável somente em processos de remodelação tecidual, inflamação e neoplasias. O processo de invasão e metástase requer a ligação da célula tumoral à MB e sua proteólise enzimática, conferindo ao tumor a habilidade de invasão tecidual. Em geral, o processo de invasão contínua depende da repetição cíclica de três etapas:

1. Ligação inicial da célula tumoral a componentes da matriz.
2. Secreção de enzimas hidrolíticas (como, por exemplo, as proteases) pelo tumor ligado à MB, ou indução de sua secreção pelas células vizinhas, causando lise da matriz.
3. Aquisição de mobilidade pelo tumor através da matriz.

A degradação da matriz é mediada pela ação orquestrada de várias famílias de proteinases: metaloproteinases, serinoproteases, aspartilproteases e cisteinoproteases

(as duas primeiras envolvidas na proteólise extracelular e as duas últimas na proteólise intracelular), sendo uma das maiores (e mais importantes) a grande família das metaproteinases (MMP)⁴³. Assim como outras enzimas, seus níveis de expressão e atividade enzimática podem ser avaliados por uma série de técnicas laboratoriais, muitas vezes correlacionando-se a um comportamento tumoral mais agressivo dos carcinomas humanos e, por conseguinte, um pior prognóstico⁴⁴.

As MMPs formam uma família de endoproteinases ou endopeptidases (enzimas proteolíticas ou hidrolíticas) zinco-dependente de amplo espectro para proteínas extracelulares, que desempenham um papel central em processos fisiológicos normais, envolvendo alterações no mecanismo de *turnover* da MEC, incluindo motilidade celular, liberação de fatores de crescimento e remodelação da MEC, como ocorre no reparo de tecidos e em doenças benignas⁴⁴.

Mas, sem dúvida, o que desperta maior interesse em investigação clínica é o seu papel na fisiopatologia das neoplasias malignas, onde as MMPs contribuem para o processo de metastatização, através da remoção de barreiras físicas, e para a invasão pela degradação de moléculas da MEC e do estroma intersticial (tais como colágeno, laminina, fibronectina, tenascina, gelatinas e proteoglicanos), sendo determinante para o potencial metastático das células neoplásicas⁴¹.

As MMPs estão amplamente distribuídas no organismo humano, onde desempenham uma série de funções fisiológicas como, por exemplo, na cicatrização⁴⁵, na reabsorção óssea⁴⁶, na involução mamária⁴⁷ e em outras funções fisiológicas associadas à gestação e ao parto (com papel importante na implantação fetal)⁴⁸. Recentemente tem-se demonstrado que as MMPs também estão implicadas em processos patológicos variados como na artrite reumatoide⁴⁹, doença periodontal⁵⁰, esclerose múltipla⁵¹, doenças cardiovasculares (como infarto do miocárdio e aneurisma dissecante)⁵² e certas alterações hematológicas⁵³.

Se, em situações fisiológicas e de reparo, a liberação de enzimas proteolíticas é um processo limitado e controlado por seus inibidores enzimáticos, num ambiente tumoral o equilíbrio homeostático orgânico é vencido pelo tumor, limitando a ação dos inibidores teciduais, prevalecendo a tendência invasiva e expansiva da neoplasia, contra a lógica restritiva do hospedeiro. Em decorrência do aumento dos níveis das MMPs em processos neoplásicos, sua atividade fora de controle e com comportamento promíscuo (quanto a afinidade por substrato), fica muito difícil determinar quais MMPs estariam patologicamente presentes em cada neoplasia específica.

Atualmente se conhecem 25 MMPs (produto de genes homólogos ou pseudo-homólogos, relacionados entre si), sendo 23 encontradas em humanos, podendo ser classificadas de acordo com critérios estruturais e funcionais em 4 grandes subgrupos de diferente especificidade ao substrato⁵⁴⁻⁵⁶:

1. Colagenases intersticiais: degradam colágeno tipo I, II e III, como a MMP-1 (colagenase 1) e a MMP-13 (colagenase 3).
2. Gelatinases: primariamente efetivas contra o colágeno IV, como a MMP-2 e a MMP-9, com importante papel na invasão tumoral.
3. Estromalisinas: degradam moléculas como proteoglicanos, laminina e fibronectina, e podem ativar outros membros da família das MMPs.
4. Metaloproteinases tipo de membrana (MT-MMPs): enzimas caracterizadas por um domínio transmembrana com amplo espectro de ação, como receptor para pró-MMP-2 e catalizador de sua ativação, e degradação do colágeno intersticial (conferindo habilidade de promover invasão celular).

Além dos quatro subgrupos citados, podem ser identificados outros dois, o das Matrilisinas e o das MMPs não-classificadas⁵⁶⁻⁶⁰ (Anexo B).

Algumas características em comum entre as MMPs são a presença de domínio catalítico que acomoda um átomo de Zn⁺⁺ no sítio ativo, um domínio pró-peptídico (mantido em seu estado latente e removido durante sua ativação) e um domínio translacional (peptídio sinal que direciona o produto para secreção) além de a maioria delas também possuir um domínio C-terminal do tipo hemopexina/vitronectina, sendo um sítio de ligação para inibidores teciduais. Todas MMPs requerem um pH neutro e Ca⁺⁺ para poderem atuar e são inibidas por uma família específica de proteínas, denominadas Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMP)⁴¹⁻⁴⁴.

Embora as MMPs sejam classificadas com base na sua afinidade por substrato, existe clara sobreposição entre as subclasses, no que diz respeito a suas afinidades (ou seja, sobreposição funcional), evento que se acentua nos processos patogênicos. Além disso, existe clara interação entre MMPs na medida em que muitas delas podem ativar outras proenzimas, o que sugere que sua ativação controlada pode ocorrer em cascata, envolvendo diferentes membros da família das MMPs⁴¹⁻⁴⁴. O processo de invasão tumoral é ampliado pelas MMPs não só através da degradação protéica da MEC, mas também pela ativação em cascata de transdução de sinal que promove motilidade e pela solubilização de fatores de crescimento ligados à MEC^{61,62}, bem como mediar a ativação de fatores de crescimento, supressão da apoptose de células tumorais, interferência na resposta imune do hospedeiro e liberação de fatores angiogênicos⁶³.

A atividade das MMPs é regulada por expressão gênica, ativação de pró-enzima e por inativação da enzima ativa por seus inibidores teciduais específicos, sendo sua expressão induzida por fatores de crescimento, indução pelo contato célula-célula e célula-matiz e até mesmo por estímulos extracelulares⁶⁴.

Um dos aspectos mais relevantes em sua dinâmica na fisiopatologia tumoral é a possibilidade de expressão, não só por células neoplásicas, como também por células estromais e endoteliais peritumorais, provavelmente através de sinais bioquímicos originários do tumor, como fatores de crescimento e citocinas. Em um estudo de análise

imuno-histoquímica (IHQ) demonstrou-se um aumento da expressão de MMP-2 em epitélio de mama, no entanto, estudos de hibridização *in situ* evidenciaram que o RNAm da MMP-2 em tecidos como câncer de mama está predominantemente localizado no estroma⁶⁵. Esta discrepância de resultados pode ser explicada pelo fato de que a MMP-2 latente liga-se à superfície de células malignas por interação com a MT1-MMP⁶⁴.

Inicialmente, as MMPs são secretadas como uma enzima inativa, a pró-MMP, com atividade regulada em nível proteico por ativadores e inibidores. O processo de regulação da atividade das gelatinases envolve vários níveis de atuação, embora ainda não completamente compreendido, podendo ocorrer desde sua transcrição, ativação na superfície celular (no caso das MT-MMPs) até um nível pós-translacional, sendo o primeiro um dos mais importantes, onde a expressão gênica das MMPs é regulada por múltiplos fatores estimuladores e inibidores, atuantes em diversas vias de sinalização⁶⁶.

A maior parte das MMPs requer a ativação catalítica por parte de outras MMPs ou serinoproteases como a plasmina e a uroquinase, sendo que a maioria delas é produzida, em tumores humanos, por células estromais, ao invés de propriamente pelas células tumorais. Um bom exemplo do papel das células estromais no câncer vem do trabalho de Guo et al. , que demonstrou que células tumorais produzem fatores estimulatórios (EMMPRIN - *Extracellular matrix metalloproteinase inducer* ou indutor extracelular de MMP), que induzem a produção de MMPs por parte de fibroblastos estromais⁶⁷.

A ativação das MMPs ocorre, com exceções, fora da célula, por serinoproteases intracelulares, ao atingir a membrana celular, sendo tal processo controlado por diversos inibidores (como TIMPs em nível tecidual e RECK [*Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs* ou proteína rica em cisteína indutora de reversão], uma glicoproteína GPI-ancorada)⁶⁸.

As gelatinases A (MMP-2, 72kDa) e B (MMP-9, 92 kDa) têm a capacidade de degradar uma vasta variedade de proteínas da MEC, entre elas o colágeno tipo IV, que forma o esqueleto proteico da MB. A MMP-2 foi primeiramente descrita e purificada a partir de tumores murinos altamente metastáticos⁶⁹, sendo ativada pela MT1-MMP⁵⁶, atuando em uma grande variedade de substratos⁴⁴, como colágeno tipo I, IV, V, VII e X, laminina, elastina, fibronectina e proteoglicanos. A MMP-9 foi inicialmente purificada a partir de macrófagos⁷⁰, sendo secretada como um precursor inativo (pró-MMP-9), podendo ser ativada por plasminogênio⁷¹ e formar um complexo inibidor de MMPs com TIMP-1 que, entretanto, pode ter papel ativador da pró-MMP-9⁷².

A invasão tumoral ocorre a partir da interface tumor-hospedeiro, onde há troca de enzimas entre células neoplásicas e estroma, modulação da MEC local e estímulo para migração local. Células neoplásicas e do estroma liberam fatores como citocinas, quimiocinas e o indutor de MMP (EMMPRIN) com regulação parácrina positiva das MMP, que, por sua vez, geram sinais quimiotáticos e também podem, ao degradar componentes da MEC, regular a disponibilidade e a atividade de fatores de crescimento e citocinas⁷³. Assim sendo, as MMPs ampliam o processo de invasão tumoral não só através da degradação das proteínas da MEC, como também da ativação de cascatas de transdução de sinal, que promovem motilidade, e da solubilização de fatores de crescimento ligados à MEC^{61,62}. Estudos *in vitro* mostraram que a MMP-2 e a MMP-9 são capazes de clivar proteoliticamente o TGF-β. A MMP-9 induz a ativação de TGF-β na superfície de queratinócitos normais, bem como de células malignas, sugerindo que tal ativação pode possuir um importante papel no remodelamento tecidual tanto em situações fisiológicas como em patologias como o câncer, facilitando invasão tumoral e angiogênese⁷⁴.

Além da expressão de MMPs ser induzida pelas interações célula-célula e célula-matriz, ela pode ocorrer pelo estímulo originário de fatores de crescimento. Muitos genes de MMP (MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12 e MMP-13) são

induzíveis por estímulos extracelulares que ativam um fator de transcrição dimérico, o complexo AP1, composto pelas proteínas JUN e FOS, que vai se ligar ao promotor de MMP, no núcleo celular, e ativar sua transcrição⁶⁴. Como prova disso, um estudo *in vitro* feito em células de melanoma humano demonstrou que a Interleucina-8 (IL-8) está envolvida em um aumento da transcrição da MMP-2, podendo assim aumentar a invasão do estroma pelas células tumorais, facilitar a angiogênese e a metastatização⁷⁵.

Originalmente descrita como um quimioatrativo de neutrófilos, descobriu-se que a IL-8 também possui propriedades mitogênicas, motogênicas e angiogênicas, através de vias autócrinas e parácrinas. A IL-8 produzida por células tumorais estimula ambas células tumorais e estromais a expressar fatores relacionados à angiogênese, promovendo assim a proliferação endotelial, crescimento tumoral e metástase.

A superexpressão de IL-8 correlaciona-se com estádio tumoral, bem como progressão e recorrência tumoral em diferentes tumores⁷⁶. No CUB, demonstrou-se expressão aumentada de IL-8 nos tumores invasivos e no carcinoma *in situ*, quando comparados a tumores não-invasivos⁷⁷, correlacionando-se com os níveis de MMP-9 em estudos com modelos ortotópicos de câncer de bexiga⁷⁸.

A RECK é uma glicoproteína, tanto solúvel como aderida à membrana plasmática, que regula ao menos três membros da família das MMPs: MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP. Seus mecanismos de ação são variados e incluem inibição da liberação da pró-MMP-9, inibição direta da MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP e inibição de processos catalíticos que levam a ativação da pró-MMP-2, entre outros⁷⁹. Já o EMMPRIN pode participar da ativação das MMPs através do estímulo da secreção destas enzimas e de seus estimuladores diretos, como a MT1-MMP⁸⁰.

Inibidores proteicos como TIMPs podem funcionar como proteínas supressoras de metástases, agindo como inibidores da invasão tecidual decorrente da degradação da MEC. Entretanto, ainda não se comprehende completamente as relações entre MMPs e

TIMPs produzidos pelas células epiteliais, estromais e endoteliais no tecido tumoral. De uma forma excessivamente simplificada, a partir de uma série de eventos muito mais complexa, desenvolveu-se o conceito de TIMPs *versus* MMPs como fatores controladores no processo de invasão tumoral e metástase. Normalmente, a produção de MMPs e TIMPs é balanceada; quando este balanço é perdido, ocorre a destruição tecidual. Portanto, a capacidade de invasão da MB por parte de um tumor pode ser o resultado do balanço entre a concentração de proteases e seus inibidores^{56,72,81}.

São quatro TIMPs descritos (1, 2, 3 e 4). Com exceção do TIMP-3, são secretados sob forma solúvel. Todos são capazes de efetuar fortes ligações com membros da família das MMPs, com consequente formação de complexos inibitórios. São importantes no estabelecimento do balanço entre síntese e degradação da MEC induzidas pelas MMPs^{56,72}.

Sabe-se que o TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 formam complexos fisiologicamente irreversíveis com todos tipos de MMPs ativadas na sua porção amino-terminal enzimática. Além disso, o TIMP-1 forma um complexo específico com a MMP-9 latente, e o TIMP-2 forma um complexo específico com a MMP-2 latente, nas regiões carboxiterminais das respectivas enzimas. Tais complexos latentes específicos levam à estabilização do mecanismo de ativação enzimática. Possuem domínios N- e C-terminal, sendo o primeiro uma unidade que pode inibir a atividade proteolítica das MMPs⁵⁶ através de uma ligação não-covalente. Em grande quantidade o TIMP-2 também inibe a MT1-MMP, comprometendo a função da MMP-2 ao impedir sua ativação, além de inibi-la diretamente. Em seu papel inibitório das MMPs, os TIMPs o fazem principalmente através da limitação da proteólise durante o remodelamento da MEC, entretanto, o processo inibitório está longe de ser tão simples assim, podendo abranger, inclusive, atividades antiangiogênicas⁷³.

Os TIMPs, além de inibidores naturais das MMPs, também apresentam papel na ativação de certas MMPs (formando complexos com pró-MMPs). Assim como ocorre

com o complexo TIMP-1|MMP-9, o complexo TIMP-2|MMP-2 tem um papel importante na ativação da pró-MMP-2 na superfície celular⁸². Portanto, os TIMPs agem, por vezes, reduzindo o crescimento tumoral, mas também podem estar associados com a progressão tumoral. Assim sendo, o conceito original de que TIMPs são responsáveis por efeitos contrários à progressão neoplásica nem sempre pode ser observado⁸³.

A indução da angiogênese é um passo essencial na via metastática, sendo um pré-requisito para o crescimento e invasão tumoral, que necessita o recrutamento de novos vasos sanguíneos para seu desenvolvimento^{84,85}. Entretanto, a angiogênese não é um evento único, mas sim uma processo em cascata originário nas células do endotélio microvascular e ativado pelas células tumorais, onde concorrem fatores inibidores da angiogênese (em geral, derivados da MEC, como trombospondina-1) e fatores promotores, originários tanto do tumor como do estroma circulante (como IL-8)⁴¹. Tal processo transcorre na seguinte via:

1. Secreção de agentes angiogênicos por parte do tumor que também pode estimular a ativação/liberação de componentes angiogênicos armazenados na MEC.
2. Tais substâncias estimulam as células endoteliais próximas a formar novos vasos, através da degradação proteolítica da MB e MEC adjacente, proliferação endotelial, migração das células endoteliais e reorganização para formação de vasos (e anastomoses entre os mesmos).

Fatores de crescimento no entorno dos vasos do tecido tumoral (como TGF- β) representam mediadores do microambiente tumoral e podem ser peças-chave no processo de invasão vascular e disseminação para um local específico⁸⁶.

As células endoteliais também sintetizam várias MMPs: MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP. Dentre estas, a MMP-2, a MMP-9 e a MT1-MMP foram descritas como exercendo importante papel na angiogênese⁸⁷. Nguyen et al. postularam um modelo para o papel das gelatinases na angiogênese. A MMP-2, constitutivamente

secretada pelas células endoteliais, seria ativada através de uma cascata de ativações enzimáticas a partir da trombina. A trombina, que se encontra elevada em situações angiogênicas, ativaría a proteína quinase C (PKC) na superfície endotelial. A PKC, ativada rapidamente, iria fosforilar a MMP-2, fazendo com que as células endoteliais iniciassem a degradação da MB. Depois desta etapa, a MMP-9 seria liberada de vesículas intracelulares, presentes nas células endoteliais, e exercearia o papel de mantenedora da degradação da MB. Com a digestão da MB, as células endoteliais passariam a fazer contato com o colágeno tipo I, do conjuntivo subjacente, que, por sua vez, iria promover *upregulation* da MT1-MMP, ativando, por *feedback* positivo, a MMP-2. Esta ativação pelo colágeno I pode ser sustentada por longos períodos, até que os novos capilares formados secretem sua lâmina basal, que servirá como barreira para que não haja o contato das células com o colágeno⁸⁸.

Assim sendo, atualmente são os fatores prognósticos clássicos citados que definem, de maneira bastante imprecisa, o comportamento do CUB, norteando as decisões terapêuticas bem como as formas e frequência de seguimento dos pacientes tratados. Porém, estes têm sido insuficientes. Por isso, pesquisas devem ser direcionadas para a identificação de alterações moleculares que possam prever com maior precisão o desenvolvimento e o potencial biológico desta neoplasia¹⁸.

Com base nessas informações, selecionamos os genes da família das MMPs mais frequentemente envolvidos no CUB e outros que estão diretamente relacionados com suas características de expressão (como vias de ativação e inibição), para estabelecer um perfil de expressão e correlacionar com fatores prognósticos, uma vez que estudos de expressão molecular dessas neoplasias são raros (figura 2). Quantificaremos estes genes pela técnica de qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo por transcriptase reversa) através dos níveis de RNAm (RNA mensageiro) no tecido de pacientes com CUB, tornando nosso trabalho inédito com relação aos existentes na literatura.

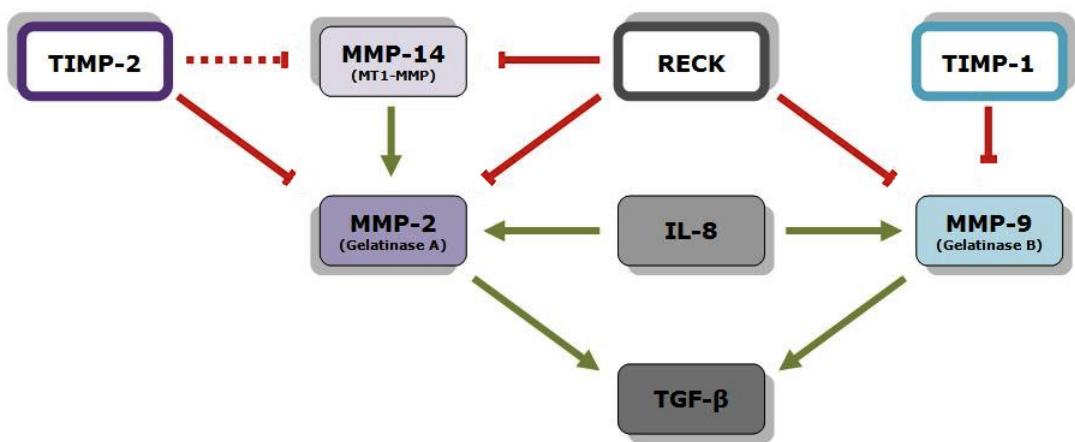


Figura 2: Genes envolvidos nas vias de indução e inibição dos genes da MMP-2 e MMP-9

2 Objetivos

2.1 Objetivo primário

Com o intuito de melhor compreender a via molecular na qual atuam as metaloproteinases, procuramos avaliar os níveis de expressão dos genes da MMP-2, MMP-9 e de seus reguladores MT1-MMP (MMP-14), RECK, TIMP-1, TIMP-2, TGF- β e IL-8, pela técnica de qRT-PCR, em pacientes portadores de CUB tratados com RTU em comparação com um grupo controle composto de amostras de bexiga sem tumor.

2.2 Objetivo secundário

Buscamos identificar associações entre os perfis de expressão das metaloproteinases e seus reguladores no CUB com os seus fatores prognósticos clássicos (grau celular, estádio tumoral e invasão angiolinfática ou linfovascular), procurando correlacionar possíveis padrões de comportamento genéticos com a caracterização do grau de agressividade tumoral.

3 Material e método

3.1 Pacientes

Foram analisadas amostras de tecido tumoral de 40 pacientes consecutivos submetidos a RTU de bexiga para o tratamento de CUB no HCFMUSP e ICESP, entre os anos de 2007 e 2008, sendo 9 mulheres e 31 homens, com idade média de 69,9 anos (47–87). O controle foi caracterizado por fragmentos de bexiga sem tumor de 6 pacientes submetidos a prostatectomia transvesical para tratamento de HPB.

Os tumores foram subdivididos de acordo com características anatomo-patológicas: grau de diferenciação histológica (alto ou baixo grau), estadiamento patológico (pTa, tumores não invasivos; pT1, carcinoma infiltrativo da lámina própria; pT2, infiltração do músculo detrusor) e invasão angiolinfática (presente ou ausente).

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Investigações Médicas LIM-55 da FMUSP.

3.2 Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas do HCFMUSP, tendo sido aprovado em 19/06/2009 (protocolo de pesquisa inscrito sob o n° 0105/09).

3.3 Processamento da amostra

Após o recebimento das amostras no laboratório, dez cortes de $10\mu\text{m}$ dos tecidos tumorais e controles foram feitos em criostato, com temperatura de -20°C , e acondicionados em microtubos de 1,5ml, autoclavados, tomando todos os cuidados para evitar a contaminação entre as amostras ou degradação do RNA. Foram mantidos a -80°C até o momento do processamento. Um dos cortes foi colocado em lâmina, fixado em formalina 10%, corado pela hematoxilina e eosina e examinado ao microscópio para comprovação da existência de tumor com a porcentagem mínima de 75% nos casos de câncer, e ausência de tumor nos casos controle.

3.3.1 Extração de RNA

Ao tecido cortado foi adicionado 10x o seu volume de solução de lise e igual volume de etanol 64%. Repassamos a solução para uma coluna GFX e centrifugamos a 10.000g por 1 minuto. À coluna adicionamos 700 μl de uma solução de lavagem própria do *kit*. Centrifugamos novamente nas mesmas condições e fizemos duas lavagens com 500 μl de outra solução de lavagem do *kit*. Descartamos o filtrado, centrifugamos por mais 1 minuto a 10.000g para secagem da coluna, repassamos a coluna para um novo tubo e adicionamos 50 μl de solução de eluição pré-aquecida no centro da coluna. Após 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugamos a coluna e o RNA foi armazenado a -80°C até sua utilização.

A pureza e a concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro (260/280 nM). A integridade foi verificada em Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA).

3.3.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de $5\mu\text{g}$ de RNA, utilizando-se o *kit* High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), o qual utiliza a transcriptase reversa MultiScribeTM e *primers* randômicos.

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de $20\mu\text{l}$. A este volume foram acrescentados $4\mu\text{l}$ de oligonucleotídeos randômicos (10x), $1,6\mu\text{l}$ do mix de dNTPs (25x), $4\mu\text{l}$ do tampão da enzima (10x), $2\mu\text{l}$ ($50\text{U}/\mu\text{l}$) da enzima transcriptase reversa e $8,4\mu\text{l}$ de água *nuclease free*. A solução foi então submetida a ciclos de temperaturas (25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos) em um termociclador Veridi (Applied Biosystems). Ao final da reação, o cDNA foi armazenado a -20°C até o uso.

3.3.3 qRT-PCR

A expressão dos genes estudados foi avaliada a partir do cDNA, utilizando a metodologia de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) (plataforma Abi7500), utilizando-se o protocolo TaqMan[®] (Applied Biosystems). Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida, que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR (figura 3).

Tabela 1: *Primers* utilizados para a quantificação da expressão dos genes MMP-2 e MMP-9 e seus reguladores no CUB.

Gene (símbolo)	Assay ID
MMP-2	Hs00160052_m1
MMP-9	Hs00382386_m1
TIMP-1	Hs00212624_m1
TIMP-2	Hs00536409_m1
MMP-14	Hs00249367_m1
RECK	Hs00379515_m1
IL-8	HS00325648_m1
TGF- β	Hs00984230_m1
B2M	Hs00212624_m1

Experimentos iniciais de quantificação absoluta com o gene controle β 2 Microglobulina (B2M) validaram o cDNA antes da realização dos experimentos de quantificação do gene de interesse. Para quantificação relativa dos genes em estudo, normalizamos a expressão destes em relação à expressão do gene controle B2M (tabela 1).

Para amplificação dos fragmentos desejados, utilizamos as seguintes condições de reação: 5,0 μ l do *master mix* TaqMan, 0,5 μ l de *primer* (contendo a sonda marcada), 3,5 μ l de água destilada deionizada e 1,0 μ l de cDNA, somando um total de 10 μ l para cada reação. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo a 50°C por 2 minutos, um passo a 94°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, e 60°C por 60 segundos.

Para calcular a expressão relativa dos oito genes alvo foi usado o método $\Delta\Delta CT$, que utiliza a seguinte fórmula: $\Delta\Delta CT = (CT \text{ do gene alvo, amostra de CUB} - CT \text{ do controle endógeno, amostra de CUB}) - (CT \text{ do gene alvo, amostra de bexiga normal} - CT \text{ do controle endógeno, amostra de bexiga normal})$. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ ⁸⁹.



Figura 3: Sistema TaqMan®: Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida, que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite então a detecção do produto do PCR em tempo real⁹⁰.

3.4 Análise estatística

Na comparação dos valores de expressão dos genes nas amostras de CUB *versus* tecido sem câncer, os dados não foram considerados como tendo distribuição normal. Para normalizar os dados, aplicamos uma transformação Log (base 10), de tal maneira que os valores menores que 1 foram relacionados a valores negativos (subexpressão), e os valores maiores que 1 foram relacionados a valores positivos (superexpressão), sendo o valor 1 associado a zero. Assim fazendo, normalizamos os dados e podemos aplicar o teste *t*-Student para comparar se a média dos dados é significativamente maior que 1 (ou maior que 0 nos dados transformados) ou menor que 1 (ou menor que 0 nos dados transformados). Assim, apresentando distribuição normal, comparamos pelo teste *t*-Student a média do Log da expressão de cada marcador para avaliar a significância dos valores (*p*). Uma outra maneira de analisarmos estes dados foi verificando a proporção de pacientes com valores de expressão abaixo e acima de 1, analisando a significância através da comparação pelo teste de aderência χ^2 .

Na comparação das expressões dos genes por grau do tumor (alto grau *versus*

baixo grau) e por invasão angiolinfática (IAL) (presente *versus* ausente), os dados não foram considerados como tendo distribuição normal. Portanto, determinamos a significância (p) comparando a distribuição (mediana) dos dois grupos usando teste de Mann-Whitney.

Na comparação das expressões dos genes por estádio patológico (pTa, pT1 e pT2), os dados também não foram considerados como tendo distribuição normal. Portanto, determinamos a significância (p) comparando a distribuição (mediana) dos três grupos usando o teste de Kruskal-Wallis. Em caso de haver diferença significativa entre os mesmos, procurou-se qual grupo diferia significativamente dos demais.

Foi considerada significância estatística um valor de $p < 0,05$.

4 Resultados

MMP-9

MMP-9 exibiu superexpressão em 59,0% dos pacientes ($p=0,27$), com expressão mediana de 1,3031 (0,0031–125,1054; $p=0,64$). Além disso, observamos que os tumores de alto grau histológico exibiram valores significativamente maiores (superexpressão) de MMP-9, quando comparados com os tumores de baixo grau ($p=0,01$). Em relação ao estadiamento patológico, observamos diferença de expressão entre os grupos ($p=0,02$), sendo significativa a diferença entre os tumores pT1 e pTa ($p=0,05$), com superexpressão no primeiro. Não encontramos diferenças na expressão deste gene quando comparamos presença ou ausência de invasão angiolinfática.

MMP-2

A maioria dos pacientes (92,5%; $p<0,001$) apresentou subexpressão de MMP-2, com expressão mediana de 0,1459 (0,027–2,1031; $p<0,001$). Não encontramos diferenças significativas entre a expressão de MMP-2 e o grau histológico ($p=0,90$), estadiamento patológico ($p=0,20$), e invasão angiolinfática ($p=0,15$).

TIMP-1

A maioria dos pacientes apresentou subexpressão de TIMP-1 (72,5%; $p<0,01$). Houve uma subexpressão estatisticamente significativa nos tumores em comparação com tecido normal (mediana=0,5088 [0,0752–12,0128]; $p<0,01$). Em relação aos fatores prognósticos clássicos (grau histológico, estadiamento patológico e invasão an-

giolinfática), não encontramos diferenças significativas associadas com os níveis de expressão de TIMP-1 ($p=1,00$, $p=0,17$ e $p=0,15$, respectivamente).

TIMP-2

A maioria dos pacientes exibiu subexpressão de TIMP-2 (95%; $p<0,001$). Houve uma subexpressão estatisticamente significativa nos tumores em comparação com tecido normal (mediana=0,0964 [0,0122–32,5932]; $p<0,001$). Quando avaliamos expressão de TIMP-2 e o estadiamento patológico, não encontramos diferenças significativas ($p=0,25$), bem como com o grau histológico ($p=0,43$) e invasão angiolinfática ($p=0,10$).

MT1-MMP (MMP-14)

A maioria dos pacientes exibiu subexpressão de MT1-MMP (72,5%; $p<0,01$). Houve uma subexpressão significativa nos tumores em comparação com tecido normal (mediana=0,493 [0,0206–30,4316]; $p=0,02$). Comparando a expressão deste gene entre os tumores de baixo e alto grau histológico, não encontramos diferenças significativas entre os mesmos ($p=0,80$). Em relação ao estadiamento patológico, observamos uma menor subexpressão de MT1-MMP entre os tumores estadiados pT2, porém, essa diferença foi marginal do ponto de vista estatístico ($p=0,09$). Não houve diferença significativa de expressão de MT1-MMP entre os pacientes com ou sem invasão angiolinfática ($p=0,56$).

RECK

A subexpressão de RECK foi observada em quase todos os pacientes com CUB (97,4%; $p<0,001$), quando comparada com tecido normal (mediana=0,1299 [0,0097–1,6598]; $p<0,001$). Em relação aos fatores prognósticos, grau histológico, estadiamento patológico e invasão angiolinfática, não observamos diferenças estatísticas significantes (respectivamente, $p=0,61$, $p=0,95$ e $p=0,77$).

IL-8

Grande parte dos pacientes subexpressou IL-8 (67,5%; $p=0,03$), quando comparados com controle normal, com expressão mediana de 0,2634 (0,0039–37,2715; $p<0,01$). Encontramos também diferença de expressão em relação ao grau histológico: tumores de alto grau exibiram valores significativamente maiores ($p<0,01$), portanto, uma menor subexpressão. Da mesma forma, houve diferença na expressão relacionada ao estádio patológico ($p=0,01$), sendo que os tumores pT1 e pT2 apresentaram uma expressão maior de IL-8 quando comparamos com tumores pTa ($p=0,02$ e $p=0,05$, respectivamente), havendo uma menor subexpressão nos casos pT1 e uma superexpressão nos casos pT2. Considerando invasão angiolinfática não encontramos diferenças significativas na expressão de IL-8 ($p=0,16$).

TGF- β

A maioria dos pacientes exibiu subexpressão de TGF- β (92,5%; $p<0,001$). Houve uma subexpressão estatisticamente significativa nos tumores em comparação com tecido normal (mediana=0,0183 [0,0006–26,89]; $p<0,001$). Não encontramos diferenças significativas em relação ao grau histológico ($p=0,27$), invasão angiolinfática ($p=0,26$) e estadiamento patológico ($p=0,66$).

O Anexo C demonstra os dados anatomicopatológicos e expressão dos genes estudados em cada um dos 40 paciente. Os resultados estão ilustrados na figura 4 e expostos na tabela 2.

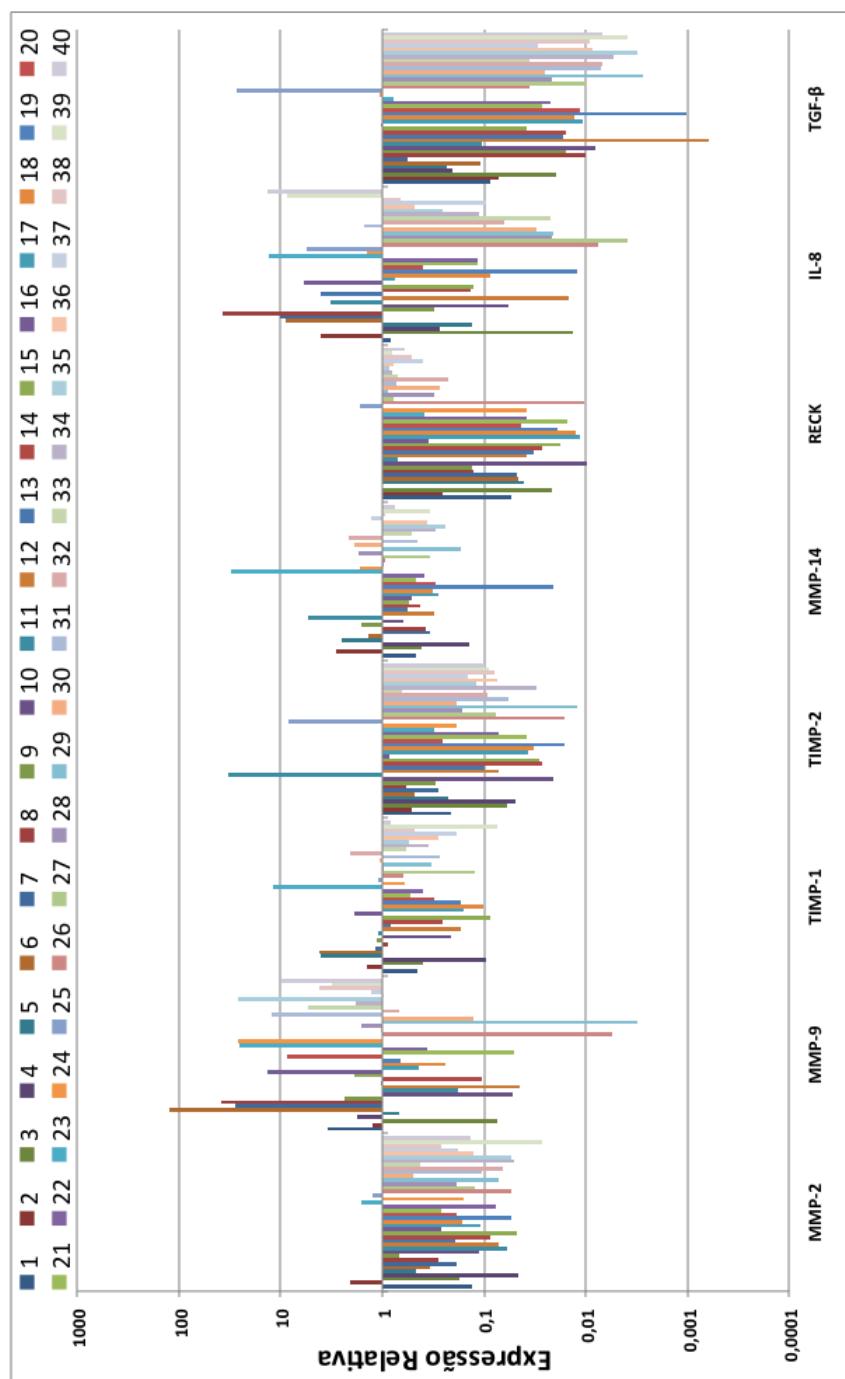


Figura 4: Perfil de expressão dos 8 genes em 40 pacientes com CUB

Tabela 2: Expressão dos 8 genes de acordo com o grau histológico, estadiamento patológico e invasão angiolinfática

	Grau histológico			Estadiamento Patológico			Invasão Angiolinfática			
	Mediana (min-máx)			Mediana (min-máx)			Mediana (min-máx)			
	Baixo (n=18)	Alto (n=22)	p*	pTa (n=19)	pT1 (n=13)	pT2 (n=8)	p**	Sem (n=36)	Com (n=4)	p*
MMP-2	0,13 (0,5-2,1)	0,17 (0,03-1,6)	0,904 (0,05-2,1)	0,17 (0,03-0,34)	0,11 (0,05-1,6)	0,23 (0,05-1,6)	0,2 (0,03-2,1)	0,13 (0,03-2,1)	0,23 (0,13-0,68)	0,148
MMP-9	0,68 (0,01-38,94)	3,29 (0-125,11)	0,012 (0,01-38,94)	0,69 (0-125,11)	8,53 (0-125,11)	2,94 (0,18-25,81)	0,026 (0-125,11)	1,25 (0-125,11)	2,94 (1,02-13,28)	0,333
TIMP-1	0,49 (0,1-4,02)	0,51 (0,08-12,01)	1,0 (0,1-4,02)	0,4 (0,08-4,13)	0,33 (0,08-4,13)	0,97 (0,17-12,0)	0,169 (0,08-12,01)	0,44 (0,08-12,01)	0,98 (0,45-1,92)	0,148
TIMP-2	0,08 (0,02-8,43)	0,11 (0,01-32,59)	0,427 (0,02-8,43)	0,08 (0,01-0,48)	0,09 (0,02-32,59)	0,26 (0,02-32,59)	0,247 (0,01-32,59)	0,09 (0,01-32,59)	0,26 (0,1-0,84)	0,101
MMP-14	0,47 (0,02-2,87)	0,49 (0,14-30,43)	0,798 (0,3-2,87)	0,52 (0,14-1,68)	0,34 (0,02-30,43)	0,76 (0,02-30,43)	0,087 (0,02-30,43)	0,46 (0,02-30,43)	0,54 (0,47-1,63)	0,557
RECK	0,18 (0,01-1,66)	0,13 (0,01-0,89)	0,606 (0,01-1,66)	0,22 (0,01-0,89)	0,05 (0,02-0,71)	0,24 (0,02-0,71)	0,953 (0,01-1,66)	0,22 (0,01-1,66)	0,09 (0,03-0,35)	0,772
IL-8	0,08 (0-37,27)	0,78 (0,01-13,63)	0,003 (0-37,27)	0,09 (0,02-13,63)	0,75 (0,01-12,93)	2,04 (0,01-12,93)	0,01 (0-37,27)	0,13 (0,31-5,85)	2,41 (0,31-5,85)	0,161
TGF-β	0,01 (0-26,89)	0,02 (0-1,07)	0,274 (0-26,89)	0,02 (0-1,07)	0,01 (0-1,02)	0,05 (0-1,02)	0,659 (0-26,89)	0,02 (0-26,89)	0,05 (0,02-1,02)	0,262

* Mann-Whitney ** Kruskal-Wallis

5 Discussão

As MMPs são expressas de forma abundante em tumores malignos, independentemente de sua origem⁹¹. Em consequência disso, podem ser empregadas como marcadores tumorais. Uma correlação significativa entre a expressão aumentada de uma MMP e um pior prognóstico, em termos de sobrevida, pode ser demonstrada em diversos casos^{91,92}. Além disso, vários genes que participam de sua ativação, bem como de sua inibição, também são estudados e correlacionados com diagnóstico e prognóstico de neoplasias.

Na busca contínua pela capacidade de predizer o comportamento de uma neoplasia, houve um grande interesse na investigação do papel das MMPs neste cenário, uma vez que sua associação com a progressão tumoral (e consequentemente a capacidade do desenvolvimento de metástases) pode fornecer um bom instrumento prognóstico. Entretanto, apesar de seu importante papel na biologia tumoral humana, limitados estudos avaliando a expressão gênica tecidual do RNAm são encontrados na literatura, sendo que a maioria avalia sua expressão proteica e/ou atividade enzimática, quer seja em tecido tumoral, soro ou urina. Através de diversos métodos laboratoriais, tanto em fluidos corporais como em amostras teciduais, muitas MMPs e seus agentes inibidores e estimuladores vêm sendo estudados em pacientes oncológicos, em especial aqueles com CUB⁸¹.

Tanto MMPs quanto TIMPs, uma vez que atinjam a corrente sanguínea, podem ter seus níveis séricos dosados. Entretanto, como as MMPs são capazes de se ligar

à matriz do tecido conectivo, nem sempre um aumento de sua expressão local se reflete em um aumento sérico plasmático de seus níveis⁹³. Em um estudo com pacientes portadores de CUB, Gohji et al. demonstraram que a relação sérica entre MMP-2 e TIMP-2 foi significativamente mais elevada em paciente com doença recorrente, bem como pior sobrevida livre de doença nestes pacientes, sugerindo tal relação como fator prognóstico independente para recorrência tumoral⁹⁴. Entretanto, estudando soro congelado de 50 pacientes portadores de CUB e 40 controles, Vasala et al. identificaram níveis menores de TIMP-2 e complexo MMP-2:TIMP-2 no CUB, bem como níveis baixos de complexo MMP-2:TIMP-2 associados a pior sobrevida câncer específica em 5 e 10 anos. Embora não tenha havido correlação entre TIMP-2 e grau/estádio, pacientes com CUB e TIMP-2 elevado apresentaram maior sobrevida livre de doença e sobrevida câncer específica em 5 e 10 anos, assim como níveis reduzidos de pró-MMP-2 e de TIMP-2 foram associados a piora da sobrevida câncer específica, após análise de sangue periférico de 84 pacientes com CUB^{95,96}.

Dosagens séricas de MMP-9 têm oferecido resultados talvez mais encorajadores na pesquisa de fatores prognósticos no CUB que os obtidos com a medida da MMP-2, embora sua função ainda seja controversa em outros tumores sólidos. Quando dosadas concentrações séricas de MMP-9 e complexo MMP-9:TIMP-1, níveis elevados foram vistos em 65% dos pacientes com tumores do trato gastrointestinal e ginecológico⁹⁷, assim como demonstraram Staack et al. ao analisar o soro de 68 pacientes com CUB (subdivididos em metastáticos e não metastáticos), encontrando associação dos níveis de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 com a identificação de CUB não invasivo⁹⁸. Em outro estudo com enfoque na capacidade preditiva do estádio tumoral, investigando o soro de 32 controles e 52 pacientes portadores de CUB (13 superficiais e 39 avançados), a MMP-9 mostrou-se mais elevada nos casos de CUB. Além disso, os níveis de MMP-9 estiveram mais elevados nos pacientes com tumores GIII em comparação aos GI-II, na doença local invasiva, quando comparada com tumores superficiais e controles, bem

como em pacientes com metástases, quando comparados com doença local invasiva ou sem metástase⁹⁹.

A dosagem dos níveis de MMPs também pode ser realizada na urina de pacientes com câncer, tanto na tentativa de se encontrar um método diagnóstico não invasivo como também um marcador prognóstico. Numa análise de urina centrifugada de 134 pacientes portadores de CUB, 5 com câncer de próstata, 33 com doença benigna e 36 controles normais, o TIMP-1 mostrou-se mais elevado nos pacientes com tumores que nos pacientes controle. Além disso, o CUB músculo-invasivo apresentou expressão mais elevada de TIMP-1 que nos tumores superficiais, bem como esteve correlacionado com volume tumoral e com menor tempo para progressão da doença. Os casos de CUB pT2-4 e G3 apresentaram relação MMP-1/TIMP-1 menor que pacientes com tumores superficiais e de baixo grau¹⁰⁰. Comparando amostras de urina de 28 pacientes portadores de CUB e 12 controles saudáveis, Nutt et al. demonstraram que a expressão da MMP-9 estava associada a estádio elevado, e que os tumores invasivos apresentavam atividade da MMP-9 maior que os pacientes controles e que os tumores superficiais¹⁰¹.

Em nosso estudo, a MMP-9 apresentou uma superexpressão (embora estatisticamente não significativa) nos pacientes com CUB, quando comparados aos pacientes controle. Quanto ao grau histológico e ao estádio do tumor, observamos uma associação significativa (superexpressão) da MMP-9 com o câncer de alto grau em relação ao câncer de baixo grau e nos tumores estádio pT1 com relação aos tumores pTa. Já a MMP-2 e a MT1-MMP estavam subexpressas em tecido maligno da bexiga, em comparação ao tecido controle sem tumor de bexiga.

Devido a seu papel na degradação da MEC, facilitando a invasão tumoral e a metástase, as MMPs são relacionadas a diversos processos tumorais, como por exemplo, nos casos de carcinoma de células renais e tumores de pulmão, onde demonstrou-se um aumento da expressão gênica tecidual de MMP-2, MMP-7 e MMP-9^{102, 103}. No

carcinoma urotelial, como na maioria dos processos tumorais, as MMPs amplamente documentadas são as gelatinases (MMP-2 e 9), que têm demonstrado correlação entre suas atividades com o aumento do grau do tumor¹⁰⁴. Em outros tumores, alguns autores sugerem que a MMP-2 aparece mais precoce e persistentemente elevada, enquanto a MMP-9 torna-se mais proeminente durante estádios mais avançados, estando a primeira envolvida na iniciação e manutenção de tumores e a segunda sendo necessária para a disseminação a distância¹⁰⁵.

A análise da expressão tecidual de RNAm por PCR de várias MMPs e seus inibidores vem sendo realizada em diversos tumores. Zhang et al. , estudando 72 amostras de adenocarcinoma gástrico, demonstraram um aumento de expressão de MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-1 e TIMP-2, com seus níveis correlacionados com estádio, invasão tumoral e *status* linfonodal, predizendo agressividade¹⁰⁶. Comparando 91 amostras de tumor de pulmão não-pequenas células, Safranek et al. identificaram aumento da expressão da MMP-7 e TIMP-1, porém, sem diferença quantitativa entre os estádios IA e IB-IIIB¹⁰². Da mesma forma, Köhrmann et al. encontraram aumento da expressão de MMP-2 e MMP-9, além de várias outras, em tecido tumoral de mama, em um painel que analisou 25 MMPs, porém, sem associação entre os níveis de expressão e o grau celular¹⁰⁷, assim como, no carcinoma colorretal, Pesta et al. identificaram uma superexpressão de MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 nos tumores em comparação com tecido normal, também sem correlação com grau e estádio¹⁰⁸. Já em 29 casos de carcinoma de células renais (tipo células claras), Struckmann et al. evidenciaram subexpressão significativa de MMP-2 em 16 amostras e de TIMP-2 em 12 amostras, assim como superexpressão de MMP-9 em 11 amostras, sem diferença de expressão do TIMP-1¹⁰³. Dados semelhantes foram demonstrados por Lichtenhagen et al. em 17 casos de câncer de próstata, onde a MMP-9 encontrava-se com tendência de superexpressão associada à subexpressão de MMP-2, MT1-MMP e TIMP-2¹⁰⁹, assim como Zhang et al. evidenciaram superexpressão de MMP-9 e expressão de MMP-2 sem diferença signifi-

ficativa, quando comparadas 20 amostras de câncer prostático com tecido hiperplásico e saudável¹¹⁰.

Diferentemente de nossa técnica laboratorial, os primeiros estudos com tecido tumoral de CUB utilizavam-se de medidas de ação enzimática (como zimografia) ou expressão proteica (como IHQ) para avaliar a relação das MMPs com a neoplasia. Estudando 54 amostras de CUB em tecido parafinado, por IHQ, evidenciou-se que a sobrevida livre de doença em 5 anos foi maior nos casos de MMP-2 negativo (77% *versus* 53%, p=0,0335), bem como sobrevida livre de recidiva em 10 anos (68% *versus* 24%, p=0,07) e sobrevida doença específica em 10 anos (77% *versus* 33%, p=0,0353), entretanto, sem diferença em sobrevida global em 5 e 10 anos (p=0,0897). A superexpressão de MMP-2 esteve correlacionada com estádio (estádio I: 52%, estádio IV: 75%, p=0,04), mas não com grau histológico¹¹¹. Em análise tecidual de 87 casos de CUB por IHQ, Vasala et al. também demonstraram que 38% dos tumores apresentavam superexpressão (>25%) de MMP-9 e que tal comportamento esteve surpreendentemente associado a melhora na sobrevida global e livre de recorrência (p=0,006 e 0,08, respectivamente)¹¹². Já Kawamura et al. demonstraram, em um estudo de zimografia com amostra tecidual de 25 pacientes com CUB, uma relação positiva entre a intensidade da atividade gelatinolítica da MMP-2 e grau celular, estádio, invasão vascular e sobrevida causa específica (p<0,05)¹¹³.

Um estudo que avaliou a ação enzimática da MMP-9 e da MMP-2, por zimografia quantitativa, em 49 amostras de tecido tumoral vesical e 7 controles, observou correlação entre maior atividade das proteases com alto grau e maior estádio tumoral¹¹⁴. Da mesma forma, estudos avaliando a expressão proteica com o uso de IHQ mostram que a superexpressão de MMP-2 e TIMP-2 estava correlacionada com pior estádio clínico em tumores de bexiga^{111,115}. Quanto ao prognóstico, examinando 51 amostras de tecido congelado contendo CUB (*Northern blot*), Hara et al. concluíram que as expressões de MMP-9 e TIMP-2 em pacientes com recorrência tumoral foram

de 2,5 e 3 vezes maiores, respectivamente, com sobrevida livre de recorrência menor para os pacientes com maior expressão¹¹⁶.

A pesquisa IHQ de MMP-2 e MMP-9 em células neoplásicas nem sempre está completamente de acordo com a expressão de RNAm das gelatinases nos tumores da bexiga, uma vez que parecem ser encontrados principalmente nas células do estroma¹¹⁴. Evidências de diferentes localizações na expressão das proteínas e do RNAm também foram observadas em outro tumores e com outras MMPs, incluindo MT1-MMP¹¹⁷⁻¹²⁰.

Utilizando-se de PCR não quantitativo, comparando 15 controles com 35 amostras de CUB, Xu et al. encontraram maior expressão de MMP-2 nos tumores, havendo correlação com o grau e estádio tumoral¹²¹. Kanayama et al. , utilizando-se de análise por PCR em tempo real em 41 amostras de CUB (14 RTUs e 27 cistectomias), observaram uma correlação direta entre os níveis de expressão de MMP-2 (mas não da MT1-MMP), o grau histológico e o estádio patológico, bem como uma piora da sobrevida câncer específica nos casos de superexpressão de MMP-2, TIMP-2 e MT1-MMP. Nos casos de tumores pT2 submetidos a cistectomia, a superexpressão de MMP-2, TIMP-2 e/ou MT1-MMP foi um forte indicador prognóstico¹²².

Já em 2006, em um destacado trabalho que analisou a expressão do RNAm de todas MMPs, seus inibidores e diversos outros fatores de crescimento através de qRT-PCR em amostras de 113 tumores de bexiga e 19 controles normais, Wallard et al. verificaram uma superexpressão de MMP-2 (localizado principalmente no estroma), MMP-9 e MT1-MMP no CUB, havendo uma correlação entre a expressão da MMP-2 e o grau celular, porém, sem essa correlação para a MMP-9¹²³.

A MT1-MMP (MMP-14) é considerada a mais importante MMP de superfície celular, envolvida na digestão da matriz pericelular e, direta ou indiretamente, está envolvida na via de ativação de pró-MMP-2. Atribui-se a ela numerosas funções, incluindo a migração e invasão celular, e parece ter uma função no caminho intracelular

de degradação do colágeno^{124,125}. Em outras neoplasias este gene já foi identificado como superexpresso¹²⁶, assim como demonstraram Kitagawa et al. em 27 amostras de CUB, onde a superexpressão do RNAm da MT1-MMP, estudada por RT-PCR, foi evidente nos casos de neoplasia, bem como seus níveis foram maiores nos casos de tumores múltiplos¹²⁷.

A subexpressão de MT1-MMP em nosso estudo talvez explique a subexpressão de MMP-2, já que a ativação da pró-MMP-2 ocorre na superfície celular e requer a formação de um complexo único envolvendo a MT1-MMP e a TIMP-2. Em outras neoplasias o gene da MMP-2 encontra-se geralmente superexpresso¹²⁸. Entretanto, sabemos que as MMPs também exercem efeitos inibitórios no crescimento tumoral, através da geração de inibidores de angiogênese como a endostatina e a tumstatina através da clivagem de componentes da MEC^{129,130}. Além disso, a ausência de uma MMP pode promover tumorigênese, como mostrado pelo aumento da susceptibilidade ao câncer de pele em camundongos que não expressavam MMP-8¹³¹.

Como citado anteriormente, acreditamos que provavelmente a MMP-2 não esteja sendo regulada por TIMP-2, pois ambas encontram-se subexpressas. Talvez a subexpressão de seus reguladores positivos MT1-MMP e IL-8 possa ser responsável por esse perfil.

Embora tenhamos encontrado um subexpressão de TIMP-1 e TIMP-2, não houve qualquer correlação com estádio, grau histológico e IAL. Sabe-se que todas as MMPs estão sob o controle de TIMPs que se ligam nas proximidades de seu domínio catalítico, evitando ligação com o seu substrato. TIMPs não são apenas simples reguladores da atividade das MMPs, mas têm um papel multifuncional que inclui a promoção de crescimento celular e a inibição da angiogênese. Portanto, o conceito original de que TIMPs são responsáveis por efeitos contrários à progressão neoplásica nem sempre pode ser observado, inclusive apresentando atividades promotoras de crescimento celular através da ativação de pró-MMP-2^{82,83}. Como exemplo, altos níveis da proteína

TIMP-2 já foram correlacionados com pior prognóstico de tumores de próstata¹³².

Resultados complexos quanto ao papel prognóstico dos TIMPs têm sido encontrados em diversos estudos, haja vista seu papel controverso, podendo-se inferir que níveis elevados de TIMP podem representar uma resposta à elevação das MMPs e assim explicaria o comportamento paradoxal deste marcador. Tal conclusão pode ser especulada após identificar-se a capacidade de inibição da MMP-2 pelo TIMP-2, mas também pela capacidade proteolítica do complexo TIMP-2|pró-MMP-2¹³³. Também um aumento no nível de expressão tecidual da TIMP-2 foi associado à redução na sobrevida doença-específica no CUB¹¹⁵. Entretanto, em outro estudo, identificou-se uma correlação oposta entre níveis urinários de TIMP-2 e grau histológico ou estádio elevado¹³⁴. Em contrapartida, as informações referentes ao papel do TIMP-1 no CUB são muito mais escassas, oscilando entre a falta de correlação com sobrevida doença específica¹⁰⁰ até seu papel como fator prognóstico independente para sobrevida câncer específica¹³⁵.

Através de IHQ de 106 amostras de tecido tumoral de CUB, evidenciou-se que o TIMP-2 foi observado em 26,4% dos fibroblastos estromais e em 69,8% das células cancerosas. Além disso, o TIMP-2 estromal e de células cancerosas associou-se significativamente com expressão de Ki67 ($p=0,02$ e $p=0,044$, respectivamente) e p53 mutada ($p=0,043$ e $p=0,045$, respectivamente). Apesar do TIMP-2 estromal estar associado significativamente com tumores de alto grau ($p<0,0001$) e estádio avançado ($p=0,001$) não foi um fator independente de sobrevida¹³⁶. Na busca de melhores resultados prognósticos, alguns estudos calcularam o balanço entre as MMPs e seus inibidores, revelando que uma ruptura no equilíbrio (elevação da relação MMP-9/TIMP-1 e MMP-2/TIMP-2) estaria associada com estádio tumoral, grau celular e progressão da doença¹³⁴.

Analizando a expressão gênica por PCR das TIMPs, no estudo de Xu et al. não houve diferença de expressão de TIMP-2 entre tecido tumoral e controle¹²¹. Já no es-

tudo de Wallard et al. , todos os TIMPs estiveram superexpressos nos tumores, havendo uma correlação entre a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 com o grau tumoral¹²³, assim como já haviam demostrado Kanayama et al. , identificando que a superexpressão de TIMP-2 foi maior nos tumores GIII em comparação com aqueles GI e nos pT2 em comparação os pTa-1, bem como esteve associada com uma piora na sobrevida¹²².

Identificamos também subexpressão da RECK nas amostras de CUB. A RECK é uma glicoproteína observada em órgãos humanos em condições normais e vários fatores oncogênicos (como ativação de Ras, a expressão da proteína de membrana latente EBV e HER-2/neu) têm a capacidade de suprimir sua expressão⁹¹. Assim, podemos acreditar que a expressão de RECK, que desempenha um papel fundamental para evitar a metástase do tumor, pode ser um bom indicador de prognóstico para pacientes com CUB. Estudos têm demonstrado uma correlação entre maior expressão de RECK e a sobrevida em pacientes com câncer colorretal e gástrico, além disso, sugere-se que o equilíbrio entre RECK/MMP-9 possa ser um indicador prognóstico para tais tumores^{137, 138}.

A RECK regula a expressão de pelo menos três genes da família das MMPs: MMP-2, MMP-9 e MMP-14. Como a RECK tem demonstrado possuir capacidade de inibir a secreção de MMP-14, MMP-2 e MMP-9, e suas atividades enzimáticas, imagina-se que sua expressão seja essencial para a angiogênese normal. *Downregulation* da RECK estaria implicada na angiogênese e progressão tumoral¹³⁹. Span et al. demonstraram, analisando a expressão tecidual de RNAm da RECK por qRT-PCR de 278 casos de câncer de mama, que um baixo nível de expressão foi predominante no tecido tumoral, bem como demonstrou-se como fator prognóstico independente para predizer o tempo de sobrevida livre de recorrência¹⁴⁰.

Como previamente descrito, o aumento da expressão do RNAm de MMP-9 pode estar associado a anormalidades de expressão de seus controladores negativos TIMPs e RECK. Demonstramos que no CUB existe um provável desequilíbrio, com uma su-

bexpressão dos reguladores negativos (TIMP-1 e RECK) da MMP-9. Esse fenômeno tem sido descrito como uma característica de doenças malignas⁷⁹. A restauração da expressão de RECK em células malignas pode reduzir a expressão de pró-MMP-9 e suprimir suas atividades relacionadas à invasão, metastatização e angiogênese¹³⁷. Assim como em nosso estudo, Wallard et al. também demonstraram por qRT-PCR uma subexpressão tecidual do RNAm da RECK, embora de maneira estatisticamente não significativa, nas amostras de CUB em comparação com controle¹²³.

Em um estudo inédito, comparando por IHQ os níveis de expressão proteica de RECK, EMMPRIN, MMP-2, MMP-9 e MMP-14 com o grau histológico e o estadiamento patológico em 127 amostras de CUB (103 pacientes submetidos a 110 RTUs e 17 cistectomias), Wittschieber et al. identificaram uma expressão significativamente decrescente de RECK conforme aumentava a invasão tumoral (pTa-1 *versus* pT2-4), bem como com o aumento do grau (baixo *versus* alto grau), assim como um comportamento exatamente inverso para o EMMPRIN, entretanto, sem identificar nenhum padrão de comportamento ou associação com as expressões das MMPs, inferindo uma potencial utilidade prognóstica prática para os mesmos, bem como uma possível via terapêutica futura¹⁴¹.

Em nosso estudo, o TGF- β mostrou-se subexpresso nas amostras de CUB, sem qualquer correlação com os fatores prognósticos clássicos. O TGF- β tem sido implicado como regulador da integridade vascular, promovendo a vasculogênese e angiogênese, assim como a proliferação e diferenciação das células endoteliais e perivasculares¹⁴²⁻¹⁴⁵. Estudos recentes têm sugerido uma associação entre altos níveis de TGF- β e mal prognóstico em câncer gástrico, hepatocelular e câncer de bexiga¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.

O TGF- β é um fator de crescimento que também controla a proliferação e diferenciação celular. Estudos *in vitro* mostraram que a MMP-2 e a MMP-9 são capazes de clivar proteolicamente TGF- β . A MMP-9 induz ativação de TGF- β na superfície de queratinócitos normais bem como de células malignas, sugerindo que a ativação do

TGF- β mediada por MMP pode possuir um importante papel no remodelamento tecidual, tanto em situações fisiológicas como em patologias como o câncer, facilitando invasão tumoral e angiogênese⁷⁴. Muitas células do câncer, incluindo o câncer de próstata, são capazes de superexpressar TGF- β , levando a um fenótipo mais agressivo. Este evento mutacional é paradoxo, uma vez que TGF- β é inibitório ao crescimento das células do câncer de próstata. Entretanto, a superexpressão de TGF- β pelas células do câncer altera as interações tumor-hospedeiro, o que facilitaria o crescimento tumoral. O TGF- β também pode estimular produção da MEC, promover angiogênese e inibir o sistema imune do hospedeiro. Além disso, altos níveis proteicos de TGF- β já foram associados com progressão e metástase do câncer de próstata¹⁵⁰. No sentido inverso, estudos demonstraram que o TGF- β pode induzir a expressão de MMPs e promover *in vitro* a invasão de células humanas por câncer em bexigas de ratos^{151,152}.

Avaliando amostras de 80 cistectomias por CUB, Kim et al. identificaram, através de IHQ, que a superexpressão do TGF- β 1 esteve associada a estádio invasivo ($p=0,02$), sendo um fator preditivo independente para progressão num seguimento de 101 meses¹⁵³. Em contrapartida, Eder et al. identificaram uma subexpressão do RNAm do TGF- β 1 em 86% das amostras de tecido tumoral vesical, quando comparados com urotélio normal, enquanto os níveis séricos da mesma proteína estavam elevados¹⁵⁴; dados semelhantes foram encontrados por Coombs et al. , que identificaram que a redução dos níveis de TGF- β 1 transcrito esteve associada a tumores de alto grau, apresentando 66% de recorrência em 1 ano, comparado com 50% nos casos de expressão normal, além de associação com doença mais avançada ($p<0,02$), inferindo que a perda da expressão possa ser um potencial marcador de doença progressiva ou prognóstico no CUB¹⁵⁵. Já Wallard et al. encontraram uma superexpressão do TGF- β no tecido tumoral em comparação ao controle, havendo uma correlação direta entre o aumento de sua expressão com o aumento do grau histológico tumoral¹²³.

Com relação à IL-8, identificamos subexpressão nos tecidos tumorais, porém, tal

subexpressão foi menor nos tumores de alto grau, quando comparados aos de baixo grau, e pT1, quando comparados aos pTa, também havendo superexpressão nos tumores pT2, quando comparados aos pTa, ou seja, havendo um aumento de expressão conforme aumentavam o grau e estádio tumoral.

A IL-8, que foi inicialmente descrita como um quimiotáctico de leucócitos, foi posteriormente relatada como um agente com propriedades mitogênica e angiogênicas. Estudo *in vitro* feito em células de melanoma humano demonstrou que a IL-8 está envolvida em um aumento da transcrição da MMP-2, podendo assim aumentar a invasão do estroma pelas células tumorais, facilitando a angiogênese e a metastatização⁷⁵. Também através de um modelo experimental *in vitro* com linhagem celular de CUB, Inoue et al. demonstraram que o aumento da expressão da IL-8 ampliou a atividade angiogênica pela indução da MMP-9⁷⁸. A superexpressão de IL-8 está associada com maior estágio, progressão de doença e recorrência em pacientes com tumores malignos, como o câncer de pulmão¹⁵⁶. Diversos estudos demonstraram recentemente que a IL-8 pode exercer a sua atividade angiogênica através da super-regulação de MMP-2 e MMP-9 em células tumorais⁷⁵. Nesta mesma linha de pesquisa, Mian et al. estudaram, em um modelo ortotópico com linhagem de CUB em ratos, o papel de uma droga com atividade contra a IL-8 (anticorpo anti-IL-8), identificando uma redução na expressão de MMP-2 e MMP-9 e redução do crescimento tumoral¹⁵⁷.

Um interessante estudo avaliando os níveis urinários de IL-8 antes, durante e após RTU seguida de BCG ou Mitomicina C, demonstrou níveis mais elevados em pacientes com CUB, quando comparados a pacientes normais, com câncer de próstata ou com CUB previamente tratado com sucesso, bem como níveis maiores em pacientes com tumores invasivos e naqueles que recidivaram. Após terapia intravesical com BCG ou Mitomicina C, a redução dos níveis de IL-8 refletiu numa redução dos índices de recidiva¹⁵⁸. A despeito de tais resultados, alguns estudos demonstram que o aumento nos níveis urinários de IL-8 após imunoterapia com BCG correlacionam-se com au-

mento da quimiotaxia para leucócitos e melhores resultados no que se refere à recidiva tumoral^{159, 160}.

Quanto a utilidade da IL-8 como marcador prognóstico, Slaton et al. estudaram, através de hibridização *in situ*, os níveis de expressão tecidual de vários genes relacionados à metástase em 64 pacientes com CUB localmente avançado submetidos a poliquimioterapia e cistectomia. A análise foi feita antes da exposição à QT e a expressão de IL-8 não correlacionou-se com a resposta ao tratamento nem com a evolução, diferentemente de outros marcadores como o VEGF e a relação MMP-9:E-cadherina¹⁶¹.

Desta forma, dentro da via molecular estudada, a superexpressão da MMP-9, associada a subexpressão dos seus reguladores negativos TIMP-1 e RECK e superexpressão do seu regulador positivo IL-8, foi o perfil relacionado ao CUB de maior agressividade (maior grau histológico e estadiamento patológico). Já a subexpressão da MMP-2 pode ser explicada pela subexpressão de MT1-MMP, TIMP-2 e IL-8, portanto não estando regulada pelos mesmos. Assim sendo, tal perfil de expressão gênica pode ser útil na caracterização do comportamento biológico tumoral nos casos de CUB, identificando os tumores de maior agressividade, primeiro passo para a individualização na terapêutica e seguimento de tais pacientes.

6 Conclusões

Tanto a MMP-2 quanto seus reguladores MT1-MMP, TIMP-2, RECK e TGF- β estão subexpressos no CUB, sem qualquer correlação com os fatores prognósticos clássicos.

A MMP-9 está superexpressa na maioria dos pacientes com CUB, bem como há uma subexpressão de seus inibidores específicos TIMP-1 e RECK. Este perfil está relacionado aos tumores de alto grau histológico e maior estádio patológico.

A IL-8 tem um aumento de seus níveis de expressão conforme aumentava o nível de agressividade tumoral (grau histológico e estádio patológico).

Assim, a análise da expressão das MMPs e seus reguladores pode ser útil na caracterização do grau de agressividade biológica do CUB.

ANEXO A

AJCC TNM – 2004

Avaliação do tumor primário (T)

T_x – Tumor primário não pode ser avaliado

T₀ – Sem evidência de tumor primário

T_a – Carcinoma papilífero não invasivo

T_is – Carcinoma *in situ*: "tumor plano"

T₁ – Tumor que invade o tecido conjuntivo sub-epitelial

T₂ – Tumor que invade músculo detrusor

- **T_{2a}** – Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna)
- **T_{2b}** – Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)

T₃ – Tumor que invade tecido perivesical

- **T_{3a}** – Microscopicamente
- **T_{3b}** – Macroscopicamente (massa extravesical)

T₄ – Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal

- **T_{4a}** – Tumor que invade próstata, útero ou vagina
- **T_{4b}** – Tumor que invade parede pélvica ou parede abdominal

Avaliação dos linfonodos (N)

Nx – Linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 – Ausência de metástase em linfonodo regional

N1 – Metástase, em um único linfonodo, com 2 cm ou menos em sua maior dimensão

N2 – Metástase, em um único linfonodo, com mais de 2 cm até 5 cm em sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos, nenhum com mais de 5 cm em sua maior dimensão

N3 – Metástase em linfonodo com mais de 5 cm em sua maior dimensão

Avaliação das metástases a distância (M)

Mx – A presença de metástase a distância não pode ser avaliada

M0 – Ausência de metástase a distância

M1 – Metástase a distância

O sufixo (m) deve ser acrescentado à categoria T apropriada para indicar tumores múltiplos. O sufixo (is) pode ser acrescentado a qualquer categoria T para indicar a presença de carcinoma *in situ* associado.

A classificação é aplicável aos carcinomas. O papiloma é excluído.

Deve haver confirmação histológica ou citológica da doença.

Categorias T (exame físico, diagnóstico por imagem e endoscopia), N (exame físico e diagnóstico por imagem) e M (exame físico e diagnóstico por imagem).

Na Classificação Patológica (pTNM), as categorias pT, pN e pM correspondem às categorias T, N e M.

Os linfonodos regionais são os da pélvis verdadeira, que são, essencialmente, os linfonodos pélvicos situados abaixo da bifurcação das artérias ilíacas comuns. A lateralidade não afeta a classificação N.

ANEXO B

Metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus substratos

Enzima	MMP	Substratos principais
Colagenase-1	MMP-1	colágeno tipo I, II, III, IV, VII, VIII e X, gelatina, entactina, perlecam, laminina, casian, pró-MMP-1, -2, -9
Gelatinase-A	MMP-2	gelatina, colágeno tipo I, II, I, III, IV, VII, X, e XI, elastina, fibrinogênio, laminina, agregam, vitronectina, decorina, plasminogênio
Estromelisina-1, Transina-1	MMP-3	agregam, laminina, gelatina, fibronectina, colágeno tipo III, IV, V, IX, X, XI e XVIII
Matrilisina-1	MMP-7	fibronectina, laminina, gelatina, agregam, colágeno tipo I, IV, IX, X, XI e XVIII
Colagenase-2		Colagenase-2
Colagenase de neutrófilo	MMP-8	colágeno tipo I, II, III, VI e X, gelatina, entactina, agregam, tenascina, pró-MMP-8
Gelatinase-B	MMP-9	gelatina, colágeno tipo I, IV, VII, X, XI e XVIII, elastina, laminina, fibronectina, vitronectina, pró-MMP-2, -9
Estromelisina-2, Transina-2	MMP-10	colágeno tipo I, III e IV, gelatina, elastina, pró-MMP-1,-8,-10
Estromelisina -3	MMP-11	fibronectina, laminina, agregam, gelatina
Elastase de macrófago, Metaloelastase	MMP-12	elastina, colágeno tipo I e IV, fibronectina, laminina, proteoglicanos, fibrinogênio
Colagenase-3	MMP-13	colágeno tipo I, II, III, VII, X e XVII, gelatina, entactina, tenascina, agregam
MT1-MMP	MMP-14	colágeno tipo I, II e III, gelatina, laminina, agregam, pró-MMP-2, -13
MT2-MMP	MMP-15	proteoglicanos, pró-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	colágeno tipo III, fibronectina, pró-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	gelatina, fibrinogênio, pró-MMP-2
Colagenase-4	MMP-18	colágeno tipo I, II e III, gelatina
Estromelisina-4	MMP-19	colágeno tipo I e IV, gelatina, laminina, tenascina

Enamelisina	MMP-20	amelogenina, agregam, laminina
X MMP	MMP-21	gelatina
C MMP (Aves)	MMP-22	gelatina, caseína
Ca-MMP	MMP-23	gelatina
MT5-MMP	MMP-24	fibronectina, gelatina, pró-MMP-2
MT6-MMP	MMP-25	colágeno tipo IV, gelatina, pró-MMP-2, -9
Matrilisina-2, Endometase	MMP-26	colágeno tipo IV, gelatina, pró-MMP-9
C MMP (Gallus)	MMP-27	...
Epilisina	MMP-28	caseína

Modificado de Nagase, Visse et al. 2006 e Visse and Nagase 2003

ANEXO C

Dados anatomo-patológicos e expressão dos genes estudados

N	G	pT	IAI	MMP-2		MMP-9		TIMP-1		TIMP-2		MMP-14		RECK		H-8		TGF- β	
				RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ	RQ
1	Alto	pT2	+	0,130082609	3,494291584	0,447978066	0,212937213	0,46992421	0,05437171	0,816203046	0,085852265								
2	Baixo	pTa	-	2,103074562	1,250062303	1,434452305	0,515530228	2,870893873	0,25774208	4,075564786	0,071743901								
3	Alto	pTa	-	0,176960589	0,073658713	0,397906122	0,059395605	0,407960111	0,021612354	0,013257936	0,019722688								
4	Alto	pT1	-	0,046343153	1,79376319	0,094830832	0,048883792	0,14058358	NA	0,272438028	0,206469416								
5	Baixo	pTa	-	0,46992421	0,680657058	4,02363656	0,221979753	2,485437801	0,040246301	0,131578894	0,232451236								
6	Alto	pT1	-	0,344481879	125,1053781	41,3389	0,47813834	1,378882955	0,045689295	8,899132785	0,109879945								
7	Alto	pT1	-	0,187439901	27,53128418	1,165137322	0,284302758	0,33645839	0,048027349	10,04217593	0,558643569								
8	Baixo	pTa	-	0,284697159	38,93511548	0,894714933	0,58761609	0,368439591	0,126744935	37,27147477	0,009971319								
9	Alto	pT2	+	0,675252977	2,381713699	1,127099753	0,295992829	1,62845065	0,129947429	0,305236628	0,015679246								
10	Baixo	pTa	-	0,110452655	0,052665427	0,213676477	0,02160243	0,615358903	0,009665997	0,058112809	0,008015454								
11	Alto	pT2	-	0,060308284	0,183	1,105347503	32,59322038	5,312901626	0,713507253	3,269341314	0,103712284								
12	Baixo	pTa	-	0,072821083	0,044966674	0,168813244	0,07186331	0,308319918	0,0375525107	0,014518136	0,000616761								

Continua na próxima página

N	G	pT	I _{AL}	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	MMP-14	RECK	I _{L-8}	TGF- β
13	Alto	pT2	+	0.192442586	1.018891197	0.829607016	0.09895036	0.56899978	0.032871931	4.00832642	0.016792956
14	Baixo	pTa	-	0.086779615	0.10460328	0.254106587	0.025561186	0.422346793	0.02986739	0.133786087	0.015635834
15	Alto	pT1	-	0.04824223	1.871246996	0.086960226	0.023271652	0.551525693	0.018085785	0.127892184	0.037864771
16	Alto	pT2	+	0.266554049	13.27831337	1.916534542	0.840605033	0.512455984	0.351111219	5.852284883	1.0181852
17	Alto	pT1	-	0.109083137	0.437695665	0.160150477	0.036435788	0.282534706	0.011414409	0.750539549	0.01067219
18	Baixo	pTa	-	0.165110068	0.239483805	0.101919358	0.032498118	0.321635822	0.012534981	0.087656203	0.012770865
19	Baixo	pT2	-	0.054655103	0.6665264521	0.169751944	0.016170409	0.020567354	0.019196572	0.012073602	0.001029386
20	Alto	pT1	-	0.18769928	8.532686247	0.308747637	0.255583446	0.302184172	0.043164827	0.393381223	0.011398596
21	Alto	pT1	-	0.26197481	0.050101583	0.527959894	0.038673791	0.473520897	0.015124172	0.11727765	0.026681804
22	Baixo	pTa	-	0.076282715	0.35700995	0.398182025	0.071322446	0.384618483	0.037655385	0.13991646	0.022127741
23	Alto	pT2	-	1.600474843	25.8125363	12.01279538	0.307253213	30.43163621	0.384218795	12.9331339	0.786217292
24	Alto	pT1	-	0.156745942	25.97406659	0.598531881	0.183964589	1.677171721	0.037759933	1.4280398	1.0665385781
25	Baixo	pTa	-	1.23841942	NA	1.113807568	8.429809331	0.971644183	1.659789171	5.540437872	26.59004007
26	Baixo	pTa	-	0.053716161	0.005470923	0.626115187	0.016226549	0.948335583	0.010337277	0.097577827	0.035280138
27	Baixo	pTa	-	0.124870102	1.039579435	0.1250943329	0.0724043	0.343290062	0.788241677	0.03900839	0.009971319
28	Baixo	pTa	-	0.185887286	1.602139755	0.0357603281	0.161488127	1.710597101	0.305533589	0.021823102	0.02121164
29	Alto	pT1	-	0.072267961	0.003107564	0.326804556	0.012178667	0.171764048	0.887756518	0.020847237	0.002746862
30	Baixo	pTa	-	0.499326743	0.128336193	1.080350916	0.188482175	1.878394384	0.271986248	0.303416543	0.025630403
31	Alto	pT1	-	0.106321112	12.15097352	0.2704624	0.053456206	0.454861742	0.729580087	1.529436278	0.006997232
32	Baixo	pTa	-	0.066315963	0.694477568	2.0655312799	0.093849664	2.157708539	0.22411947	0.02456693	0.006320059
33	Baixo	pTa	-	0.426760927	5.314743256	0.580995675	0.649544377	0.51673625	0.698951255	0.022498927	0.036071419
34	Baixo	pTa	-	0.050084222	1.813780658	0.353675944	0.030237863	0.297404834	0.813714817	0.110337875	0.005251699
35	Alto	pT1	-	0.05420238	26.3184022	0.544309832	0.121203226	0.238737979	0.84748634	0.254369923	0.003127011
36	Baixo	pTa	-	0.126087748	0.976708529	0.280583096	0.075128286	0.36437604	0.776804768	0.484309095	0.008572906
37	Alto	pTa	-	0.179555282	1.303147149	0.186532639	0.144937217	1.304502763	0.40486023	0.096588819	0.02974931
38	Alto	pT2	-	0.25984947	4.115306832	0.489540458	0.079411954	0.943765278	0.519874293	0.668037039	0.009232903
39	Alto	pT1	-	0.027044893	3.088700532	0.075232508	0.090778849	0.33645839	0.791983133	8.603955124	0.003857816
40	Alto	pT1	-	0.135043865	9.754040753	0.817052111	0.100168444	0.745613559	0.596414171	1.363270552	0.006862738

Referências

- 1 Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66(6 Suppl 1):4–34.
- 2 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277–300.
- 3 Michaud DS. Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol Oncol*. 2007;25(3):260–8.
- 4 Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(17):1276–99.
- 5 Ries LAG, Krapcho M, Mariotto AB, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, et al.. SEER Cancer Statistics Review; 1975-2004; 2007.
- 6 Srougi M, de Goes GM. Urological cancer: treatment strategies. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1983;29(11-12):199–209.
- 7 INCA. Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional. Vol. 4; 2010. Available from: http://www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=10.
- 8 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74–108.
- 9 Muthami LN, Katsivo MN, Kinoti SN, Omondi O, Karama M, Karumba P, et al. Pattern of Schistosoma mansoni infection after intervention in Mwea irrigation scheme in Kenya. *East Afr Med J*. 1995;72(2):94–100.
- 10 Johansson SL, Cohen SM. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Semin Surg Oncol*. 1997;13(5):291–8.
- 11 Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas J C R. Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*. 2000;92(6):285–94.
- 12 Cummings KB, Barone JG, Ward WS. Diagnosis and staging of bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 1992;19(3):455–65.

- 13 Konety BR, Getzenberg RH. Urine based markers of urological malignancy. *J Urol.* 2001;165(2):600–11.
- 14 Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol.* 1998;22(12):1435–48.
- 15 Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Cheville J, Gasser T, et al.. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, eds. WHO classification of classification of tumors of the urinary system and male genital organs.; 2004.
- 16 Greene FL, Sabin LH. A worldwide approach to the TNM staging system: collaborative efforts of the AJCC and UICC. *J Surg Oncol.* 2009;99(5):269–72.
- 17 Sabin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. Wiley-Blackwell. 2009;7th edn.:262–265.
- 18 Pashos CL, Bottelman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002;10(6):311–22.
- 19 Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodriguez J. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol.* 2000;164(3 Pt 1):680–4.
- 20 Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(1):73–8.
- 21 Holzbeierlein JM, Smith J J A. Surgical management of noninvasive bladder cancer (stages Ta/T1/CIS). *Urol Clin North Am.* 2000;27(1):15–24, vii–viii.
- 22 Duque JL, Loughlin KR. An overview of the treatment of superficial bladder cancer. Intravesical chemotherapy. *Urol Clin North Am.* 2000;27(1):125–35, x.
- 23 Rivera I, Wajsman Z. Bladder-sparing treatment of invasive bladder cancer. *Cancer Control.* 2000;7(4):340–6.
- 24 Bottelman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoconomics.* 2003;21(18):1315–30.
- 25 Hong YM, Loughlin KR. Economic impact of tumor markers in bladder cancer surveillance. *Urology.* 2008;71(1):131–5.
- 26 Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer.* 2000;89(3):630–9.

- 27 Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M, et al. Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(7):1348–54.
- 28 Nieder AM, Manoharan M, Vyas S, Soloway MS. Evaluation and work-up of hematuria among primary care physicians in Miami-Dade County: an anonymous questionnaire-based survey. *J Urol.* 2007;177:357 (Abstract 1082).
- 29 Johnson EK, Daignault S, Zhang Y, Lee CT. Patterns of hematuria referral to urologists: does a gender disparity exist? *Urology.* 2008;72(3):498–502; discussion 502–3.
- 30 Singh R, Saleemi A, Walsh K, Popert R, O'Brien T. Near misses in bladder cancer - an airline safety approach to urology. *Ann R Coll Surg Engl.* 2003;85(6):378–81.
- 31 Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. 1976. *J Urol.* 2002;167(2 Pt 2):891–3; discussion 893–5.
- 32 Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Ahmed T, Weiselberg LR, et al. Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Urol.* 1985;133(3):403–7.
- 33 Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffoux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol.* 2006 Mar;49(3):466–5; discussion 475–7.
- 34 Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med.* 1994;331(19):1259–64.
- 35 Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Melamed J, Zhang ZF, Sheinfeld J, et al. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. *J Urol.* 1994;152(2 Pt 1):388–92.
- 36 Cordon-Cardo C. p53 and RB: simple interesting correlates or tumor markers of critical predictive nature? *J Clin Oncol.* 2004;22(6):975–7.
- 37 Stein JP, Ginsberg DA, Grossfeld GD, Chatterjee SJ, Esrig D, Dickinson MG, et al. Effect of p21WAF1/CIP1 expression on tumor progression in bladder cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(14):1072–9.
- 38 Fletcher O, Easton D, Anderson K, Gilham C, Jay M, Peto J. Lifetime risks of common cancers among retinoblastoma survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(5):357–63.

- 39 Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res.* 1997;71:241–319.
- 40 Sugino T, Gorham H, Yoshida K, Bolodeoku J, Nargund V, Cranston D, et al. Progressive loss of CD44 gene expression in invasive bladder cancer. *Am J Pathol.* 1996;149(3):873–82.
- 41 Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991;64(2):327–36.
- 42 Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature.* 1980;284(5751):67–8.
- 43 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 1999;189(3):300–8.
- 44 Nagase H, Woessner J J F. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21491–4.
- 45 Wolf C, Chenard MP, Durand de Grossouvre P, Bellocq JP, Chambon P, Basset P. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* 1992;99(6):870–2.
- 46 Everts V, Delaisse JM, Korper W, Niehof A, Vaes G, Beertsen W. Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol.* 1992;150(2):221–31.
- 47 Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol.* 1992;118(5):1271–82.
- 48 Jeffrey JJ. Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin Perinatol.* 1991;15(2):118–26.
- 49 Harris J E D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med.* 1990;322(18):1277–89.
- 50 Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991;26(3 Pt 2):230–42.
- 51 Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol.* 1997;72(2):155–61.
- 52 Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery.* 1997;122(2):264–71; discussion 271–2.

- 53 Guedez L, Lim MS, Stetler-Stevenson WG. The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Crit Rev Oncog.* 1996;7(3-4):205–25.
- 54 Shingleton WD, Hodges DJ, Brick P, Cawston TE. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem Cell Biol.* 1996;74(6):759–75.
- 55 Woessner J J F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;5(8):2145–54.
- 56 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827–39.
- 57 Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature.* 1990;348(6303):699–704.
- 58 Belaaouaj A, Shipley JM, Kobayashi DK, Zimonjic DB, Popescu N, Silverman GA, et al. Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14568–75.
- 59 Llano E, Pendas AM, Knauper V, Sorsa T, Salo T, Salido E, et al. Identification and structural and functional characterization of human enamelysin (MMP-20). *Biochemistry.* 1997;36(49):15101–8.
- 60 Pendas AM, Knauper V, Puente XS, Llano E, Mattei MG, Apte S, et al. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J Biol Chem.* 1997;272(7):4281–6.
- 61 McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5):534–40.
- 62 McCawley LJ, Matrisian LM. Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. *Curr Biol.* 2001;11(1):R25–7.
- 63 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161–74.
- 64 Westermark J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* 1999;13(8):781–92.
- 65 Uriá JA, Stahle-Backdahl M, Seiki M, Fueyo A, López-Otin C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal-epithelial cell interactions. *Cancer Res.* 1997;57(21):4882–8.
- 66 Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 1995;270(10):5331–8.

- 67 Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C. Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1997;272(1):24–7.
- 68 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463–516.
- 69 Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin GR. Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(5):2268–72.
- 70 Vartio T, Hovi T, Vaheri A. Human macrophages synthesize and secrete a major 95,000-dalton gelatin-binding protein distinct from fibronectin. *J Biol Chem.* 1982;257(15):8862–6.
- 71 Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Sipley J, Nagase H, French DL, Quigley JP. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13066–76.
- 72 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562–73.
- 73 Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003;36(1):128–37.
- 74 Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000;14(2):163–76.
- 75 Luca M, Huang S, Gershenwald JE, Singh RK, Reich R, Bar-Eli M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol.* 1997;151(4):1105–13.
- 76 Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci.* 2005;10:853–65.
- 77 Izawa JI, Slaton JW, Kedar D, Karashima T, Perrotte P, Czerniak B, et al. Differential expression of progression-related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep.* 2001;8(1):9–15.
- 78 Inoue K, Slaton JW, Kim SJ, Perrotte P, Eve BY, Bar-Eli M, et al. Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer. *Cancer Res.* 2000;60(8):2290–9.
- 79 Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(22):13221–6.

- 80 Nabeshima K, Inoue T, Shimo Y, Sameshima T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int.* 2002;52(4):255–64.
- 81 Szarvas T, vom Dorp F, Ergün S, Rübben H. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2011;8(5):241–54.
- 82 Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res.* 1998;8(3):179–86.
- 83 Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001;10(2):383–92, x.
- 84 Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, Bouck NP. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res.* 1998;58(6):1298–304.
- 85 Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(3):253–70.
- 86 Turkeri LN, Erton ML, Cevik I, Akdas A. Impact of the expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor receptor on the prognosis of superficial bladder cancer. *Urology.* 1998;51(4):645–9.
- 87 Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest.* 1999;103(9):1237–41.
- 88 Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(10):960–70.
- 89 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
- 90 Wikipedia. PCR en tiempo real — Wikipedia, La enciclopedia libre; 2011. [Internet; descargado 28-julio-2011]. Available from: http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=PCR_en_tiempo_real&oldid=48141312.
- 91 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(5):667–71.
- 92 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(1):273–82.
- 93 Moscatelli D, Rifkin DB. Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1988;948(1):67–85.
- 94 Gohji K, Fujimoto N, Fujii A, Komiyama T, Okawa J, Nakajima M. Prognostic significance of circulating matrix metalloproteinase-2 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio in recurrence of urothelial cancer after complete resection. *Cancer Res.* 1996;56(14):3196–8.

- 95 Vasala K, Kuvaja P, Turpeenniemi-Hujanen T. Low circulating levels of ProMMP-2 are associated with adverse prognosis in bladder cancer. *Tumour Biol.* 2008;29(5):279–86.
- 96 Vasala K, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and matrix metalloproteinase-2 in complex with the inhibitor (MMP-2:TIMP-2) as prognostic markers in bladder cancer. *Clin Biochem.* 2007;40(9–10):640–4.
- 97 Zucker S, Lysik RM, DiMassimo BI, Zarrabi HM, Moll UM, Grimson R, et al. Plasma assay of gelatinase B: tissue inhibitor of metalloproteinase complexes in cancer. *Cancer.* 1995;76(4):700–8.
- 98 Staack A, Badendieck S, Schnorr D, Loening SA, Jung K. Combined determination of plasma MMP2, MMP9, and TIMP1 improves the non-invasive detection of transitional cell carcinoma of the bladder. *BMC Urol.* 2006;6:19.
- 99 Guan KP, Ye HY, Yan Z, Wang Y, Hou SK. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology.* 2003;61(4):719–23.
- 100 Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjayabun PH, Robinson MC, Neal DE, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2576–82.
- 101 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(1):99–104.
- 102 Safranek J, Holubec J L, Topolcan O, Pesta M, Klecka J, Vodicka J, et al. Expression of mRNA MMP-7 and mRNA TIMP-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2007;27(4C):2953–6.
- 103 Struckmann K, Mertz K, Staller P, Krek W, Schraml P, Moch H. mRNA expression analysis of metastatic markers in clear-cell renal cell carcinoma. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 2005;89:178–83.
- 104 Kanda K, Takahashi M, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. The role of the activated form of matrix metalloproteinase-2 in urothelial cancer. *BJU Int.* 2000;86(4):553–7.
- 105 Murnane MJ, Shuja S, Del Re E, Cai J, Iacobuzio-Donahue C, Klepeis V. Characterizing human colorectal carcinomas by proteolytic profile. *In Vivo.* 1997;11(3):209–16.
- 106 Zhang M, Zhu GY, Gao HY, Zhao SP, Xue Y. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2010;

- 107 Kohrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009;9:188.
- 108 Pesta M, Topolcan O, Holubec J L, Rupert K, Cerna M, Holubec LS, et al. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Res.* 2007;27(4A):1863–7.
- 109 Lichtenhagen R, Musholt PB, Stephan C, Lein M, Kristiansen G, Hauptmann S, et al. mRNA expression profile of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in malignant and non-malignant prostatic tissue. *Anticancer Res.* 2003;23(3B):2617–24.
- 110 Zhang L, Shi J, Feng J, Klocker H, Lee C, Zhang J. Type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 and -9) in prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2004;7(4):327–32.
- 111 Vasala K, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology.* 2003;62(5):952–7.
- 112 Vasala K, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) immunoreactive protein in urinary bladder cancer: a marker of favorable prognosis. *Anticancer Res.* 2008;28(3B):1757–61.
- 113 Kawamura K, Kamiya N, Suyama T, Shimbo M, Oosumi N, Suzuki H, et al. In situ gelatinolytic activity correlates with tumor progression and prognosis in patients with bladder cancer. *J Urol.* 2004;172(4 Pt 1):1480–4.
- 114 Davies B, Waxman J, Wasan H, Abel P, Williams G, Krausz T, et al. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. *Cancer Res.* 1993;53(22):5365–9.
- 115 Grignon DJ, Sakr W, Toth M, Raverty V, Angulo J, Shamsa F, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. *Cancer Res.* 1996;56(7):1654–9.
- 116 Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidono S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 2001;165(5):1769–72.
- 117 Poulsom R, Hanby AM, Pignatelli M, Jeffery RE, Longcroft JM, Rogers L, et al. Expression of gelatinase A and TIMP-2 mRNAs in desmoplastic fibroblasts in both mammary carcinomas and basal cell carcinomas of the skin. *J Clin Pathol.* 1993;46(5):429–36.
- 118 Hoyhtya M, Fridman R, Komarek D, Porter-Jordan K, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, et al. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase 2

- and its specific inhibitor TIMP-2 in neoplastic tissues with monoclonal antibodies. *Int J Cancer.* 1994;56(4):500–5.
- 119 Visscher DW, Hoyhtya M, Ottosen SK, Liang CM, Sarkar FH, Crissman JD, et al. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int J Cancer.* 1994;59(3):339–44.
- 120 Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(7):2730–4.
- 121 Xu K, Hou S, Du Z. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in bladder carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 2002;115(5):743–5.
- 122 Kanayama H, Yokota K, Kurokawa Y, Murakami Y, Nishitani M, Kagawa S. Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer. *Cancer.* 1998;82(7):1359–66.
- 123 Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, Burtt G, Mills IG, Warren A, et al. Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. *Br J Cancer.* 2006;94(4):569–77.
- 124 Zucker S, Hymowitz M, Conner C, DeClerck Y, Cao J. TIMP-2 is released as an intact molecule following binding to MT1-MMP on the cell surface. *Exp Cell Res.* 2004;293(1):164–74.
- 125 Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004;23(1-2):101–117.
- 126 Yoshida S, Takahashi H. Expression of extracellular matrix molecules in brain metastasis. *J Surg Oncol.* 2009;100(1):65–8.
- 127 Kitagawa Y, Kunimi K, Ito H, Sato H, Uchibayashi T, Okada Y, et al. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human urothelial carcinomas. *J Urol.* 1998;160(4):1540–5.
- 128 Li Y, Ma J, Guo Q, Duan F, Tang F, Zheng P, et al. Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus.* 2009;22(8):664–7.
- 129 Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, Lively JC, Maeshima Y, Yang C, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell.* 2003 Jun;3(6):589–601.
- 130 Lafleur MA, Handsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. *Expert Rev Mol Med.* 2003 Sep;5(23):1–39.

- 131 Balbín M, Fueyo A, Tester AM, Pendás AM, Pitiot AS, Astudillo A, et al. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nat Genet.* 2003;35(3):252–7.
- 132 Ross JS, Kaur P, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman RA, Kallakury BVS. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expression in prostate cancer. *Mod Pathol.* 2003;16(3):198–205.
- 133 Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, Breitkopf K, Steurer P, Klein CE, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem.* 1999;274(30):21056–62.
- 134 Monier F, Mollier S, Guillot M, Rambeaud JJ, Morel F, Zaoui P. Urinary release of 72 and 92 kDa gelatinases, TIMPs, N-GAL and conventional prognostic factors in urothelial carcinomas. *Eur Urol.* 2002;42(4):356–63.
- 135 Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology.* 2004;63(3):602–8.
- 136 Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A, Mavrommatis I, Panayotopoulou EG, Tsirmpa I, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003;9(15):5573–81.
- 137 Takeuchi T, Hisanaga M, Nagao M, Ikeda N, Fujii H, Koyama F, et al. The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(16):5572–9.
- 138 Song SY, Son HJ, Nam E, Rhee JC, Park C. Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2006;42(1):101–8.
- 139 Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell.* 2001;107(6):789–800.
- 140 Span PN, Sweep CGJ, Manders P, Beex LVAM, Leppert D, Lindberg RLP. Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. *Cancer.* 2003;97(11):2710–5.
- 141 Wittschieber D, Stenzinger A, Klauschen F, Stephan C, Jung K, Erbersdobler A, et al. Decreased RECK and Increased EMMPRIN Expression in Urothelial Carcinoma of the Bladder Are Associated with Tumor Aggressiveness. *Pathobiology.* 2011;78(3):123–131.

- 142 Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*. 1995;121(6):1845–54.
- 143 Sato Y. Activation of latent TGF-beta at the vascular wall—roles of endothelial cells and mural pericytes or smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb*. 1995;2(1):24–9.
- 144 Vinals F, Pouyssegur J. Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol*. 2001;21(21):7218–30.
- 145 Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res*. 2002;62(21):6021–5.
- 146 Hung TT, Wang H, Kingsley EA, Risbridger GP, Russell PJ. Molecular profiling of bladder cancer: involvement of the TGF-beta pathway in bladder cancer progression. *Cancer Lett*. 2008;265(1):27–38.
- 147 Izadifar V, de Boer WI, Muscatelli-Groux B, Maille P, van der Kwast TH, Chopin DK. Expression of transforming growth factor beta1 and its receptors in normal human urothelium and human transitional cell carcinomas. *Hum Pathol*. 1999;30(4):372–7.
- 148 Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999;17(2):607–14.
- 149 Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, Bergamini C, Colucci S, Schiraldi O, et al. Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol*. 2002;161(1):183–93.
- 150 Soulitzis N, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Expression analysis of peptide growth factors VEGF, FGF2, TGFB1, EGF and IGF1 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Int J Oncol*. 2006;29(2):305–14.
- 151 Dehnavi E, Soheili ZS, Samiei S, Ataei Z, Aryan H. The effect of TGF-beta2 on MMP-2 production and activity in highly metastatic human bladder carcinoma cell line 5637. *Cancer Invest*. 2009;27(5):568–74.
- 152 Kawamata H, Kameyama S, Nan L, Kawai K, Oyasu R. Effect of epidermal growth factor and transforming growth factor beta 1 on growth and invasive potentials of newly established rat bladder carcinoma cell lines. *Int J Cancer*. 1993;55(6):968–73.
- 153 Kim JH, Shariat SF, Kim IY, Menesses-Diaz A, Tokunaga H, Wheeler TM, et al. Predictive value of expression of transforming growth factor-beta(1) and its receptors in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*. 2001;92(6):1475–83.

- 154 Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. Expression of transforming growth factors beta-1, beta 2 and beta 3 in human bladder carcinomas. *Br J Cancer*. 1997;75(12):1753–60.
- 155 Coombs LM, Pigott DA, Eydmann ME, Proctor AJ, Knowles MA. Reduced expression of TGF beta is associated with advanced disease in transitional cell carcinoma. *Br J Cancer*. 1993;67(3):578–84.
- 156 Yuan A, Chen JJW, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci*. 2005;10:853–65.
- 157 Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, et al. Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):3167–75.
- 158 Sheryka E, Wheeler MA, Hausladen DA, Weiss RM. Urinary interleukin-8 levels are elevated in subjects with transitional cell carcinoma. *Urology*. 2003;62(1):162–6.
- 159 Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Mohrle K, Cecchini MG, Studer UE. Urinary Interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*. 2000;164(6):2129–33.
- 160 Sagnak L, Ersoy H, Ozok U, Senturk B, Ercil H, Bahar G, et al. Predictive value of urinary interleukin-8 cutoff point for recurrences after transurethral resection plus induction bacillus Calmette-Guerin treatment in non-muscle-invasive bladder tumors. *Clin Genitourin Cancer*. 2009;7(2):E16–23.
- 161 Slaton JW, Millikan R, Inoue K, Karashima T, Czerniak B, Shen Y, et al. Correlation of metastasis related gene expression and relapse-free survival in patients with locally advanced bladder cancer treated with cystectomy and chemotherapy. *J Urol*. 2004;171(2 Pt 1):570–4.