

LEONARDO LIMA BORGES

**Identificação de marcadores biomoleculares preditivos de
resposta à quimioterapia neoadjuvante no carcinoma urotelial
de bexiga**

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

Programa de Urologia

Orientadora: Profa. Dra. Katia Ramos
Moreira Leite

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Borges, Leonardo Lima
Identificação de marcadores biomoleculares
preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante
no carcinoma urotelial de bexiga / Leonardo Lima
Borges. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Biomarcadores 2.Quimioterapia
adjuvante 3.Terapia neoadjuvante 4.Neoplasias da
bexiga urinária

USP/FM/DBD-206/21

Dedicatória

Aos meus pais, Beatriz e Luciano, que se dedicaram integralmente a formação dos seus filhos, me propiciando uma criação valorosa em princípios e rica em oportunidades.

À minha querida e amada Camila, companheira de todas as horas, em quem busco o meu equilíbrio e serenidade.

Agradecimento especial

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e influenciaram o que sou hoje: familiares, amigos, mestres, colegas e pacientes. Aprendi e continuo aprendendo com as mais diversas formas de convívio.

Agradecimentos

A todos os pacientes atendidos e envolvidos na elaboração dessa tese. Aqueles que passaram por um momento delicado e frágil de suas vidas e mesmo assim optaram por contribuir na geração de conhecimento científico.

À Profa. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, pela atenção, cuidado, paciência e zelo na minha orientação. Professora em todos os sentidos e significados. Não tenho palavras para agradecer por ter acreditado na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. William Carlos Nahas, que me acolheu no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, abriu as portas da Pós-Graduação e permitiu a realização deste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, pelos anos de aprendizado e demonstração de liderança positiva durante a residência. E por sempre me mostrar as virtudes de um grande homem.

Ao Prof. Dr. Antônio Marmo Lucon, responsável pelo cuidado diário na formação de um grande número de urologistas que passaram pela Disciplina de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Um exemplo.

Ao Dr. José Roberto Colombo Jr, pelos anos de convívio e amizade. Por me orientar e incentivar desde o início da minha carreira. Por me convidar para atuar no grupo de Uro-Oncologia do ICESP e no Hospital Israelita Albert Einstein. Jamais esquecerei quem me estendeu a mão.

Ao Dr. Gustavo Lemos, por me ensinar como um bom médico deve ser, com comprometimento, disponibilidade e profissionalismo com seus pacientes. É um privilégio tê-lo como exemplo e, acima de tudo, amigo.

A todos que formam a minha equipe de trabalho diário. Tantos que já se dedicaram e acreditaram neste sonho de poder atuar com excelência e humanismo. Tenham certeza de que cada um de vocês tem participação nesta Tese. Na pessoa do Dr. Marco Yorioka, companheiro, amigo e conselheiro, agradeço a cada um de vocês.

Aos membros da Banca de Qualificação: Dr. Romulo Mattedi, Dra. Maria Aparecida Koike Folgueira, Dr. Daher Chade e Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho, que me corrigiram e sugeriram valiosas melhorias.

À Elisa de Arruda Cruz, secretária da Pós-Graduação, pelo inestimável auxílio nas tarefas burocráticas.

À equipe do LIM-55 pela ajuda constante em todas as etapas de realização desta Tese. Destaco especial e valorosa ajuda que tive das Dra. Nayara Viana e Profa. Sabrina Reis.

Aos amigos que fiz em minha vida. Impossível particularizar alguém, mas todos importantes.

À Camila, meus pais, irmã, sobrinhos e toda família: obrigado por formarem o núcleo que me dá sentido à vida; responsáveis pelos melhores momentos que levarei para a eternidade.

A Deus, por cuidar de mim todos os dias, com evidentes demonstrações de proteção.

Agradecimento institucional

Agradeço o apoio do ICESP, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, sem o qual a realização desta Tese não seria possível.

Normalização

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Generalidades.....	15
1.2 Identificação de Biomarcadores preditivos de resposta a terapia	16
1.3 Marcadores individuais de resposta	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Casuística	29
3.2 Critérios de Inclusão.....	29
3.3 Critérios de exclusão.....	30
3.4 Avaliação da resposta ao tratamento.....	30
3.5 Microarranjo tecidual (TMA).....	31
3.6 Reações Imunohistoquímica	32
3.7 Análise da expressão das proteínas.....	32
3.8 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	47
5.1 Anidrase carbônica.....	47
5.2 Citoqueratina 5/6.....	48
5.3 Variantes histológicas	50
5.4 Limitações	51
6. CONCLUSÃO	54
7. ANEXOS.....	56
8. REFERÊNCIAS.....	62

Lista de abreviaturas

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

CAIX – Anidrase Carbônica 9

CaUB – Carcinoma urotelial de Bexiga

CCT- Carcinoma de Células Transicionais

CEC – Carcinoma de células escamosas

CK – Citoqueratinas

CR – Cistectomia Radical

CRISPR - *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

GC – Gencitabina/Carboplatina

GCT – Gencitabina/cisplatina/Taxol

HE – Hematoxilina-eosina

ICESP - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

IHQ – Imuno-histoquímica

miRNA – Micro RNA

MMR – *Mismatch repair*

MSI – Instabilidade microssatélite

MVAC – Metotrexato, Vinblastina, Adriamicina (Doxorrubicina) e Cisplatina

QT – Quimioterapia

RTU – Ressecção Transuretral

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TMA – *Tissue microarray*

Lista de tabelas

Tabela 1. Características dos tipos intrínsecos de carcinoma urotelial relacionados a anormalidades genéticas específicas segundo Choi et al(CHOI; CZERNIAK; OCHOA; SU et al., 2014).....	17
Tabela 2. Anticorpos relacionados com diferentes tipos moleculares e função correspondente.....	33
Tabela 3. Tabela de dados demográficos, resultados anatomopatológicos e características do tratamento.	37
Tabela 4. Tabela de distribuição dos pacientes de acordo com o status de expressão dos Biomarcadores versus Resposta à QT.....	40
Tabela 5. Tabela de distribuição dos pacientes de acordo com o status de expressão dos Biomarcadores versus Óbito.....	43

Lista de figuras

Figura 1. Tipos moleculares do carcinoma urotelial de bexiga como descrito por Choi et al.(CHOI; CZERNIAK; OCHOA; SU et al., 2014).	18
Figura 2. “Tissue microarray” – TMA das amostras analisadas neste estudo em pequeno aumento (à esquerda) e grande aumento (à direita).	32
Figura 3. Variantes do CaUB: A: Sarcomatóide; B: Escamoso; C: Plasmocitóide e D: Micropapilar.	39
Figura 4. Imuno-expressão de CAIX positiva (A) e negativa (B). Imuno-expressão de CK5/6 positiva (C) e negativa (D).	42
Figura 5. Curva de Kaplan-Meier mostra menor sobrevida câncer-específica relacionada à Metástase linfonodal, Diferenciação divergente e Perda de expressão de CK5/6.	44

Borges LL. *Identificação de marcadores biomoleculares preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante no carcinoma urotelial de bexiga* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

O tratamento para o Carcinoma urotelial da Bexiga (CaUB) com invasão da camada muscular própria envolve a Cistectomia Radical (CR) e a linfadenectomia regional. A quimioterapia (QT) neoadjuvante baseada em Cisplatina apresenta melhora na sobrevida em 5 anos de 5 a 10%. Ao se estratificar os pacientes de acordo com o grau de resposta à QT observa-se sobrevida aos 5 anos de 80-90% para os quimiossensíveis, 30-40% para os quimiorresistentes e 50% para aqueles tratados com CR isolada. Neste contexto é importante selecionar os pacientes sensíveis à QT, que obteriam melhora da sobrevida com o tratamento combinado. Sabe-se que o CaUB é bastante heterogêneo em termos de alterações genéticas, expressão de RNA e proteínas. Neste estudo foram avaliados os marcadores imuno-histoquímicos (IHQ) que potencialmente confeririam resposta à QT neoadjuvante em CaUB invasivos submetidos a CR. Entre 2009 e 2016, 384 pacientes foram operados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), sendo que 52 receberam QT neoadjuvante e 25 tinham os espécimes cirúrgicos disponíveis, tanto da primeira intervenção cirúrgica (Ressecção Transuretral - RTU) quanto da CR para avaliação. Este material foi objeto do estudo da expressão das proteínas, relacionando os achados à presença de resposta patológica à QT e à sobrevida. O intervalo médio entre o fim da QT e a cirurgia foi de 58,7 (± 21) dias. Dezesesseis (64%) pacientes vieram a óbito ao longo do tratamento com um tempo médio de 49,3 ($\pm 52,7$) dias. Dez (40%) pacientes apresentaram resposta à QT. Foram identificadas Variantes Histológicas do CaUB em 36% dos casos e nenhum desses pacientes respondeu à QT neoadjuvante ($p=0,002$). O biomarcador Anidrase Carbônica 9 (CAIX) foi expresso por 53% dos não-respondedores sendo negativo em todos os pacientes que responderam à QT. Nossos resultados mostram que expressão de CAIX ($p=0,005$) e a presença de variantes histológicas no CaUB são potenciais biomarcadores de não-resposta à QT neoadjuvante e podem ser facilmente usados na prática clínica.

Descritores: Biomarcadores; Quimioterapia adjuvante; Neoplasias da bexiga urinária; Terapia neoadjuvante.

Borges LL. *Identification of biomolecular markers predictive of response to neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Treatment for muscle-invasive urothelial bladder cancer (MIBC) involves radical cystectomy (RC) and regional lymphadenectomy. Neo-adjuvant chemotherapy (NAC) based on platinum improves 5-year survival from 5 to 10%. A 5-year survival rate of 80-90% for chemosensitive patients, 30-40% for chemoresistant patients, and 50% for those treated with isolated RC were observed when patients were stratified. It is crucial to select patients sensitive to QT who have better survival outcomes using combined treatment. It is known that MIBC is quite heterogeneous in terms of genetic alterations, RNA, and protein expression. In this study, immunohistochemical markers that could potentially confer response to neoadjuvant QT in MIBC treated with RC were evaluated. Between 2009 and 2016, 384 patients underwent surgery at the Cancer Institute of the State of São Paulo (ICESP). Of those, 52 received neoadjuvant chemotherapy, and surgical specimens were available from 25 patients, both from the first surgical intervention (Transurethral Resection) and RC. The protein expression of the surgical specimens was evaluated to relate the presence of pathological response to QT and survival. The average interval between the end of chemotherapy and surgery was 58.7+ 21 days. Sixteen (64%) patients died during treatment (mean 49.3+ 52.7 days). Ten (40%) patients responded to the QT. MIBC histological variants were identified in 36% of the cases, and none of these patients responded to neoadjuvant chemotherapy ($p=0.002$). The biomarker Carbonic Anhydrase IX (CAIX) was expressed by 53% of non-responders and was negative in all patients responding to QT. Our results show that CAIX expression ($p=0.005$) and the presence of histological variants in MIBC are potential biomarkers for non-responders to neoadjuvant QT and can be used in clinical practice.

Descriptors: Biomarkers; Chemotherapy adjuvant; Urinary bladder neoplasms; Neoadjuvant therapy.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Generalidades

Em 2015 foram diagnosticados 386.000 novos casos de câncer de bexiga em todo o mundo,(1, 2) acarretando um importante impacto econômico, tanto pela significativa frequência do tumor inicial e seu tratamento, como devido às suas altas taxas de recorrência e necessidade de monitorização rotineira com Cistoscopia (3). O tipo mais comum de tumor vesical é o carcinoma urotelial (CaUB), que corresponde a mais de 90% dos casos (4).

O tratamento padrão para o CaUB não músculo-invasivo consiste na sua remoção por ressecção transuretral (RTU), seguida de imunoterapia com Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) intra-vesical nos casos onde há alto risco de recidiva e progressão. Naqueles que já apresentam invasão da camada muscular própria (músculo detrusor) o tratamento adequado envolve a Cistectomia radical (CR) e a linfadenectomia regional. A quimioterapia (QT) baseada em Cisplatina tem sido cada vez mais recomendada, com resultados favoráveis de resposta em 38% dos casos, quando utilizada de forma neoadjuvante.(5, 6) Porém este benefício não é duradouro, culminando com uma modesta melhora na sobrevida em 5 anos de 5-10% quando comparando a QT neoadjuvante vs cistectomia isoladamente (7, 8). Essa variação de resposta fica mais intrigante quando se analisa todo o grupo que recebeu QT e estratifica-se os pacientes entre sensíveis (respondedores) vs resistentes (não-respondedores) à QT neoadjuvante. É encontrada a impactante diferença na sobrevida câncer específica em 5 anos: sendo 80-90% para os quimiossensíveis, 30-40% para os quimiorresistentes e

50% para aqueles tratados com CR isolada. (5). É nítida a necessidade de melhor seleção dos pacientes que deverão seguir para a QT neoadjuvante.

1.2 Identificação de Biomarcadores preditivos de resposta a terapia

O emprego das tecnologias genômicas levou a avanços em testes moleculares de muitos tipos de cânceres, com benefício clínico e prático já bem estabelecido. Entretanto, o CaUB ainda não teve significantes avanços neste sentido e seu manejo clínico mudou pouco nos últimos 30 anos.

A habilidade de se identificar quais pacientes responderiam a determinado tipo de tratamento geraria uma mudança nesta abordagem clínica, direcionando à QT aqueles que realmente se beneficiariam, evitando a toxicidade relacionada ao tratamento sistêmico e atrasos no tratamento cirúrgico daqueles não candidatos à QT.(9)

São chamados de Biomarcadores preditivos algumas características moleculares do tumor inicial que possam prever o potencial benefício a uma determinada terapia. Diversos autores já revelaram que o CaUB é bastante heterogêneo em termos de linhagens genéticas, expressão de RNA e proteínas relacionadas.(10-12) Esta classificação molecular já é incorporada ao tratamento de outros tipos de tumores, tais como melanoma, mama e pulmão. Em bexiga, poucos são os estudos envolvendo biomarcadores genômicos ou relacionados à expressão de RNA. Uma revisão recente identificou apenas 11 estudos neste sentido até Janeiro de 2015.(13)

Sabe-se que o CaUB da bexiga compreende 2 fenótipos distintos, a doença “superficial” e a músculo-invasiva, que são definidas por 2 vias moleculares diferentes. O CaUB não-invasivo ou não-infiltrativo na lâmina própria, erroneamente denominado de superficial, é associado a alterações do receptor de Tirosina-quinase FGFR3 e aos genes HRAS e PIK3CA, enquanto a doença músculo-invasiva envolve alterações nos genes supressores, incluindo p53, p16 e Rb.(14) Uma avaliação baseada no Atlas Genômico dos Cânceres (TCGA) identificou alteração na via do PI3K-Akt-mTOR em 42% dos casos de CaUB e na via RTK-MAPK em 45%.(10)

Choi e cols. descreveram 2 tipos de CaUB músculo-invasivos, à semelhança da mama. Classificaram em basais e luminais que por sua vez se subdividem em luminal e p53-like, que se caracterizam por anormalidades genéticas específicas (Figura 1). Os basais envolvem alterações no EGFR, STAT3, HIF1 e genes relacionados a resposta imune, enquanto os tumores luminais relacionam-se com mutações em FGFR3, PPAR γ , ERBB2 e ERBB3.(15) De modo interessante, exibem alterações histológicas específicas e respondem de modo distinto a QT neoadjuvante (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos tipos intrínsecos de carcinoma urotelial relacionados a anormalidades genéticas específicas segundo Choi et al.(CHOI; CZERNIAK; OCHOA; SU et al., 2014).

Tipo intrínseco	Histologia	Quimiosensibilidade
Claudina low	Sarcomatóide	Intermediária
Basal	Escamoso	Alta
Luminal	Papilífero	Alta
P53-like	Infiltrativo	Baixa

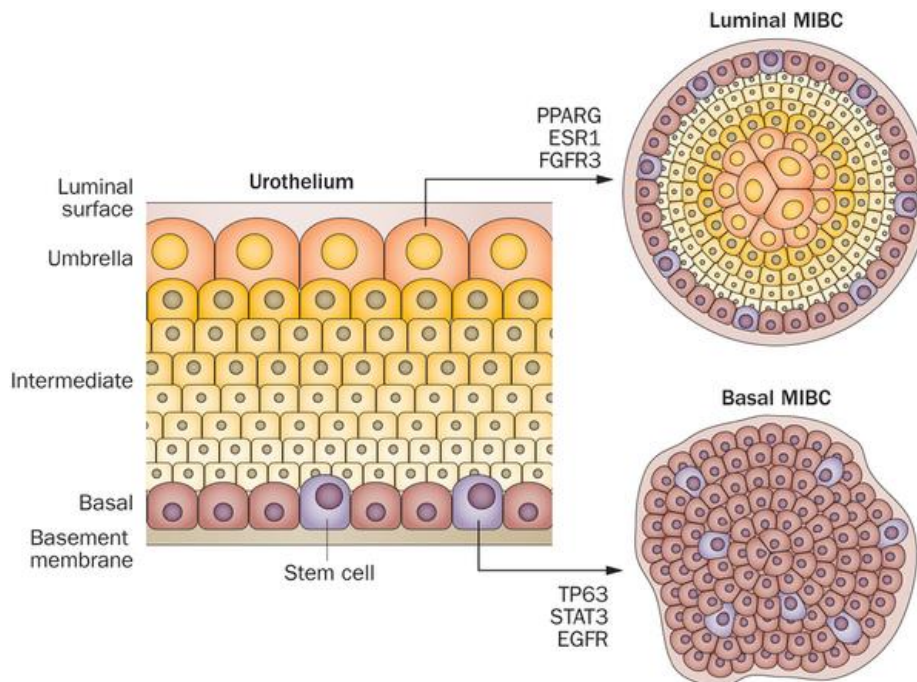


Figura 1. Tipos moleculares do carcinoma urotelial de bexiga como descrito por Choi et al.(CHOI; CZERNIAK; OCHOA; SU et al., 2014).

Apesar dos esforços em andamento, esses dados são iniciais e novas séries devem ser estudadas para que haja um avanço no entendimento das vias moleculares envolvidas no desenvolvimento e na progressão do CaUB, contribuindo assim para uma seleção de pacientes para tratamentos específicos de acordo com cada assinatura molecular e genética individual.

1.3 Marcadores individuais de resposta

- **TP53**

O fator de transcrição p53 é um dos mais importantes genes supressores de tumor, exercendo importante papel no reparo do DNA e em outros processos celulares, incluindo promoção da apoptose e a regulação do ciclo celular.(16, 17)

TCGA demonstrou que há inativação do p53 em 76% dos casos de CaUB, que pode ser ocasionada por mutações no próprio TP53 ou combinada com amplificações de MDM2, regulador negativo de TP53.(10) Entretanto, resultados conflitantes em alguns estudos favorecem quimiorresistência ou quimiossensibilidade associadas à diferentes tipos de mutação do p53.(18, 19) Uma análise retrospectiva, usando IHQ, mostrou que pacientes com aumento na expressão de p53, que se relaciona com sua mutação, tiveram benefício de sobrevida quando expostos à QT neoadjuvante com Cisplatina.(20) Por outro lado, um estudo fase III não demonstrou associação significativa entre expressão de p53 e resposta à Metotrexate, Vinblastina e Doxorubicina.(21)

- **TP63**

Assim como o p53, o p63 é relacionado à promoção da apoptose e à regulação do ciclo celular. Quando mutado, dá origem à uma série de malformações de tecidos envolvendo o ectoderma e o mesoderma (Lábio palatino e Ectrodactilia, por exemplo).(22) Além das síndromes congênitas, tem especial uso na identificação de Tumores de células escamosas de Cabeça e Pescoço e Tumores da Vulva, além de ser importante marcador de diferenciação escamosa dos Adenocarcinomas da Próstata.(23)

Em CaUB a mutação do p63 foi identificada como potencial fator de risco para menor sobrevida.(24) Embora não se tenha ainda uma total compreensão do papel do p63 na promoção da progressão do câncer de bexiga, estudos relataram que o p63 é expresso em tumores superficiais, em contraste à sua baixa expressão nos CaUB invasivos.(25) Como a doença superficial raramente leva à óbito, a expressão de p63, portanto, está associada a bons resultados

clínicos. No entanto, pesquisas recentes indicam que pacientes com tumores invasivos e p63-positivos têm um prognóstico pior do que pacientes com tumores invasivos musculares sem expressão de p63.(26) A mutação de p63 também foi descrita como importante fator de resistência à QT por meio de mecanismos que envolvem Myc.(27).

- **Receptores da Tirosina Quinase: EGFR (HER1) e ERBB2 (HER2)**

Acredita-se que a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) esteja associada à progressão do CaUB e a resultados clínicos ruins. *Mansour e cols* investigaram o significado prognóstico da expressão de EGFR em pacientes que receberam QT adjuvante à base de cisplatina após CR para CaUB avançado (pN+ em 91% dos casos). O EGFR foi superexpresso em 43% dos casos, correlacionando-se significativamente com a recorrência da doença ($p=0,021$). A superexpressão de EGFR foi identificada como um preditor independente para a recorrência da doença ($p=0,04$). (28)

HER2 ou ERBB2 é outro receptor de Tirosina Quinase que vem sendo usado como biomarcador preditivo de resposta a terapia alvo e QT em câncer urotelial e outros tipos de tumores. O papel do HER2 no desenvolvimento do CaUB tem sido estudado e ele parece predizer o potencial de resposta à QT. Mutações no ERBB2 foram associadas à resposta completa à QT baseada em Platina.(29) Este estudo sugere que o ERBB2 pode ser utilizado como um bom biomarcador genômico para a seleção de pacientes com CaUB. Neste contexto destacam-se estudos clínicos e fase I que evidenciam alta resposta à terapia alvo para HER2

e estudos de fase II avaliando Trastuzumab (NCT01828736) e Lapatinib (NCT0094955).

- **Genes de reparo do tipo *mismatch***

Os genes de reparo do tipo *mismatch* (MMR) corrigem erros que ocorrem espontaneamente durante a replicação do DNA. A instabilidade microssatélite (MSI) é a condição genética que resulta quando há falha / mutação destes genes (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2).(30)

Mutações germinativas desta natureza estão relacionadas à Síndrome de Lynch ou síndrome do carcinoma colorretal hereditário não ligado a polipose. Seu silenciamento por metilação também é descrito em muitas neoplasias esporádicas.(31) Em 2017, o Pembrolizumabe (anticorpo monoclonal PD-1) teve seu uso liberado para pacientes com tumores sólidos metastáticos e presença confirmada de mutação ou silenciamento dos genes de reparo.(32) Nesse contexto, também no CaUB a caracterização do perfil de expressão MMR pode trazer informações em relação à predição de resposta à QT neoadjuvante. Utilizando a técnica de CRISPR, a inativação do MSH2 foi relacionada à resistência à QT baseada em Cisplatina. In vitro, as células de CaUB com MSH2 mutado mostraram uma redução na apoptose mediada pelo quimioterápico. Esses resultados ainda não foram validados através da IHQ, como descrito no nosso estudo.(33, 34)

- **Anidrase Carbônica 9**

Hipóxia pode surgir em consequência do rápido crescimento dos tumores, incluindo o câncer de bexiga, e é uma importante reguladora de expressão gênica. A enzima Anidrase Carbônica 9 (CAIX) tem sua atividade induzida por hipóxia e regula os níveis de pH intracelular, a proliferação celular, a adesão celular e também a progressão tumoral (35) Uma expressão fraca de CAIX é observada na mucosa gástrica normal, intestino delgado, vias biliares e ductos seminais, no entanto, sua expressão está ausente em outros sistemas orgânicos, incluindo o trato urinário. Em contraste, a CAIX é expressa em abundância como uma consequência direta da hipóxia em numerosos cânceres. Estudos demonstraram que, em muitos tipos de câncer, a alta expressão de CAIX é acompanhada de um fenótipo mais agressivo de tumor e um mau prognóstico.(36)

Klatte e cols. avaliaram a expressão de CAIX em uma série de pacientes com CaUB. Identificaram ausência de CAIX no tecido urotelial normal, enquanto 71% dos CaUB expressaram a enzima. Ela foi mais presente nos tumores não invasivos (Ta) versus invasivos (T1-T4) ($p < 0,001$), nos casos de câncer de bexiga de baixo grau versus alto grau ($p < 0,001$) e nas metástases versus tumor primário correspondente ($p = 0,032$). Dentre os pacientes Ta-T1 que foram submetidos à RTU, a expressão mais elevada de CAIX foi associada com pior sobrevida livre de recidiva ($p = 0,001$) e a um risco 6,5 vezes maior de progressão para doença músculo-invasiva ($p = 0,006$). Nos pacientes que foram submetidos à CR, a maior expressão foi associada a uma pior sobrevida global ($p = 0,003$). A expressão de CAIX foi o mais forte fator prognóstico independente de sobrevida

livre de recidiva (*hazard ratio*=2,29; $p=0,001$) e sobrevida geral (*hazard ratio*=1,9; $P<0,001$). (37).

- **Citoqueratinas (CK) – CK 5/6, CK7 e CK20**

As CK são proteínas encontradas no citoesqueleto do tecido epitelial. Elas ajudam as células a resistir ao estresse mecânico. A expressão dessas CK é específica para determinados órgãos ou tecidos.

A CK 5/6 é normalmente encontrada no epitélio escamoso e carcinoma de células escamosas (CEC). Na bexiga, a presença de diferenciação escamosa, confirmada pela expressão de CK 5/6, é associada a um pior prognóstico. Ainda, nos casos de CaUB avançado, incluindo os de diferenciação escamosa, a presença de CK 5/6 chega a 50% e é associada a pior prognóstico. (38) Em outra série, a expressão positiva de CK 5/6 foi observada em 20% dos CaUB, tendo associação estatisticamente significativa com o grau do tumor ($p<0,05$) e invasão muscular ($p=0,049$). Já a recorrência ($p=1,0$) e sobrevida ($p=0,054$) não foram influenciados pela expressão ou não desta proteína. (39)

Hammam e cols. avaliaram 200 pacientes de CaUB e demonstraram que as CK 7 e 20 estão expressas em até 80% dos casos. De modo interessante, a expressão de CK 20 diminui à medida que se aumenta o grau do tumor - 100% em pTa, 83.3% em pT1 e 50% em pT2-3 ($p<0.01$), enquanto a CK 7, de forma contrária, aumenta com a elevação do grau do tumor - pTa 20%, 47.5% em pT1, e 100% em pT2-T3 ($p<0.01$). (40) Essa variedade de expressão das CK pode ser

usada para se identificar um padrão biológico que confira uma maior resposta à QT adjuvante no CaUB.

- **GATA 3**

A proteína GATA3 é um fator de transcrição codificado pelo gene GATA3. Ela controla a expressão de uma ampla gama de outros genes biologicamente e clinicamente importantes. É especialmente relacionada ao desenvolvimento embrionário de vários tecidos, bem como nas respostas imunes inflamatórias e humorais e no funcionamento adequado do endotélio vascular.(41)

No CaUB é expressa em 70% dos casos e é relacionada ao perfil molecular luminal ao lado da CK20 (42) Tem-se observado uma diminuição significativa na expressão da GATA3 nas neoplasias uroteliais. A perda da expressão foi associada a tumores de alto grau ($p=0,002$) e músculo-invasivos ($p<0,001$), enquanto, de modo contrário, a expressão forte de GATA3 foi identificada como um preditor independente de mau prognóstico.(43) De modo interessante, *Inoue e cols.* notaram que a ausência de expressão de GATA3 foi significativamente associada com menor sobrevida livre de recorrência ($p= 0,037$ para todos os casos, $p=0,026$ para tumores músculo-invasivos) e menor sobrevida câncer-específica ($p=0,007$ para todos os casos, $p=0,012$ para tumores músculo-invasivos, $p=0,035$ para casos com QT adjuvante).(44)

Assim, considera-se que GATA3 possa ser também importante na identificação de tumores que possam ser mais responsivos à QT neoadjuvante.

JUSTIFICATIVA

As análises moleculares dos CaUB mostram perfis de mutação distintos que podem influenciar a resposta à terapia neoadjuvante. Assim, o encontro de biomarcadores preditivos de resposta é altamente desejável pois evitaria o atraso na terapia cirúrgica definitiva naqueles não respondedores, poupando-os ainda dos efeitos colaterais da quimioterapia, selecionando pacientes sensíveis a terapia cujos estudos mostram melhora na sobrevida quando adotada essa abordagem.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Identificação de marcadores de resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em cisplatina de carcinomas uroteliais de bexiga invasivos ($\geq pT2$) pela técnica imuno-histoquímica utilizando tissue microarray.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Entre o janeiro de 2009 e o julho de 2016 384 pacientes foram submetidos a CR no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Neste período 52 pacientes receberam QT neoadjuvante baseada em cisplatina. Desse grupo, 25 pacientes tinham disponíveis para análise tanto os espécimes cirúrgicos referentes à primeira intervenção diagnóstica (RTU do CaUB) quanto da CR, tendo sido objeto de análise nessa pesquisa.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do ICESP através do protocolo número 1061/16 (anexo A). Todos os pacientes incluídos concordaram em participar do estudo, pessoalmente ou através de um responsável legal, quando falecidos, e assinaram o Termo de consentimento Livre e Esclarecido (anexo B).

3.2 Critérios de Inclusão

- Pacientes portadores de CaUB invasivo ($\geq pT2$) e que foram submetidos à QT neoadjuvante baseada em cisplatina e submetidos a CR no ICESP;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido;
- Disponibilidade de material arquivado proveniente da RTU e da CR do CaUB para revisão e estudo imuno-histoquímico.

3.3 Critérios de exclusão

- Pacientes que não concordaram em participar do estudo;
- A falta ou inadequação de material proveniente da RTU do CaUB com o diagnóstico de carcinoma invasivo $\geq pT2$ para revisão e estudo imuno-histoquímico;
- A falta ou inadequação de material proveniente da CR após a QT neoadjuvante para revisão e estudo imuno-histoquímico;

3.4 Avaliação da resposta ao tratamento

Foi realizada uma análise retrospectiva da evolução dos pacientes portadores de CaUB tratados com QT neoadjuvante baseada em cisplatina. Foram identificados neste estudo os esquemas de tratamentos realizados, tais como as drogas quimioterápicas utilizadas, o número de ciclos, bem como a toxicidade associada a cada tratamento. Os intervalos de tempo entre a primeira RTU, a QT e a CR também foram considerados para análise. Por fim, foi considerada resposta patológica ao tratamento quando o estadiamento anatomopatológico final mostrou um *downstaging* para $\leq pT1$, conforme avaliação uniforme realizada por uma experiente uropatologista (KRML). Qualquer achado divergente de padrão urotelial foi classificado como Variante Histológica (Diferenciação Divergente).

3.5 Microarranjo tecidual (TMA)

A técnica utilizada neste trabalho para construção do TMA ou “tissue microarray” foi adaptada de *Kononen e cols.*(45) Ela é empregada para avaliar a expressão de proteínas, através de reações IHQ, a partir de um bloco de parafina contendo centenas de fragmentos de tecido tumoral, analisados lado a lado, permitindo maior padronização das reações e rapidez nas análises.

Para esta confecção, foram reanalisadas as lâminas correspondentes a RTU, sendo marcadas 3 áreas mais bem representativas da neoplasia. O mesmo foi feito nos blocos de parafina doadores correspondentes.

Usando um sistema de precisão mecânico (Beecher Instruments, Sum Prairie, WI), cilindros de 0,6 milímetros de diâmetro foram retirados dos blocos de parafinas doadores contendo os CaUB previamente selecionados pelo patologista, através de punção, e posteriormente transportados para um bloco de parafina receptor ficando no mesmo com um intervalo de 0,3 milímetros com o bloco vizinho. A disposição no bloco receptor foi definida em um sistema cartesiano de coordenadas e o conjunto das amostras constitui a micromatriz tecidual. Três amostras tumorais foram recolhidas por paciente, uma vez que foi demonstrado que a análise de pelo menos duas amostras é comparável com a análise de uma secção de tecido inteiro em mais de 95% dos casos.(45)

Após a conclusão do bloco de parafina de TMA, foram cortadas 100 lâminas de 4µm de espessura e todas foram armazenadas em congelador comum a -20°C até a realização da reação IHQ (figura 2).

3.6 Reações Imunohistoquímica

As lâminas parafinadas dos TMAs foram submetidas à técnica de IHQ utilizando os anticorpos primários específicos para cada reação através da streptavidina-biotina-peroxidase (Ultravision Detect System Anti-polyvalent, HRP, Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) (Figura 2). Os anticorpos utilizados neste projeto estão expostos na tabela 2, assim como a padronização dos seus respectivos resultados.

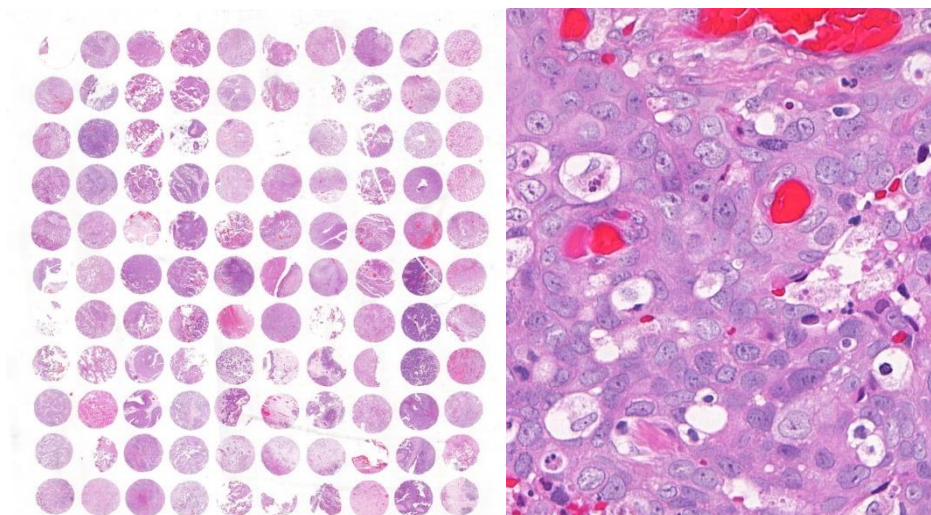


Figura 2. “Tissue microarray” – TMA das amostras analisadas neste estudo em pequeno aumento (à esquerda) e grande aumento (à direita).

3.7 Análise da expressão das proteínas

Foram analisados os perfis de expressão de proteínas que caracterizam os fenótipos basal e luminal, além de genes de reparo do DNA como exposto na tabela 2.

A imuno-expressão de cada proteína foi analisada por uma experiente uropatologista (KRML) usando uma escala semiquantitativa dos resultados. Para

cada proteína / potencial biomarcador analisado foi feita a padronização de expressão: ausente, fraca (+), moderada (++) e forte (+++).

Tabela 2. Anticorpos relacionados com diferentes tipos moleculares e função correspondente.

Anticorpo	Clone	Marca	Tipo molecular
Citoqueratina 5/6	CK5/6.007	Biocare	Basal / Escamoso
Citoqueratina 7	BC1	Biocare	Luminal
Citoqueratina 20	Ks20.8	Biocare	Luminal
P63	BC4A4	Biocare	Basal / Escamoso
P53	DO7	Biocare	P53-like
GATA3	L50-823	Biocare	Luminal
EGFR	SP84	Cell Marque	Basal / Escamoso
Her2	EP3	Biocare	Luminal
CAIX	EPR4151(2)	Abcam	Hipóxia
MLH1	G168-15	Biocare	MMR
MSH2	FE11	Biocare	MMR
MSH6	BC/44	Dako	MMR
PMS2	A16-4	Biocare	MMR

MMR – *DNA mismatch repair*

3.8 Análise estatística

Para a análise estatística os achados IHQ foram divididos em 2 categorias: expressão ausente / fraca *versus* expressão moderada / forte, de acordo com suas respectivas reações IHQ.

Foi comparada a presença de resposta à QT neoadjuvante de acordo com os perfis de expressão IHQ dos marcadores citados. A análise da sobrevida também foi relacionada com os resultados de expressão IHQ. O teste exato de Fisher foi utilizado para correlacionar a resposta à QT com idade, sexo, variante histológica, metástase linfonodal, óbito e expressão das Citoqueratinas 5/6, 7 e 20, GATA3, HER2, EGFR, p63, p53, CAIX, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. A análise de Kaplan-Meier com log-rank foi realizada para se caracterizar a

sobrevida. Para a avaliação estatística foi utilizado o software SPSS versão 20.0 (IBM, EUA) e foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Dezoito (72%) pacientes eram do sexo masculino, a média de idade foi 61,84 ($\pm 7,13$) anos e a mediana 62 anos. Receberam em média 4 ciclos de QT (± 1). A escolha das drogas quimioterápicas foi estabelecida pela equipe titular de acordo com o estado geral do paciente, sendo assim distribuídas: 9 Gemcitabina + Carboplatina + Taxol (36%), 8 Gemcitabina + Cisplatina (32%), 4 MVAC (16%), 2 Carboplatina + Taxol (8%), 1 Gemcitabina + Taxol (4%) e 1 Gemcitabina (4%).

O tempo médio entre a RTU e a QT foi 89,36 ($\pm 56,47$) dias, enquanto entre a QT e a CR foi 58,07 ($\pm 21,03$) dias. Dez (40%) pacientes apresentaram resposta à QT neoadjuvante ($\leq pT1$), sendo pT0 - 4 (16%), pTis - 1 (4%), pT1 - 5 (20%). Os demais foram estadiados pT2 - 3 (12%), pT3 - 9 (36%) e pT4 - 3 (12%). Em média foram ressecados 26,28 ($\pm 11,9$) linfonodos, com mediana N=24 (variável de 11 a 61). Oito (32%) pacientes tiveram linfonodos acometidos. (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela de dados demográficos, resultados anatomopatológicos e características do tratamento.

Pacientes	
N	25
Idade (anos)	
Média (DP)	61,84 (\pm 7,13)
Mediana (Variação)	62 (48 a 78)
Sexo	
Masculino	18
Feminino	7
Quimioterapia	
Ciclos	3,96 (\pm 1,01)
Resposta	10 (40%)
Estadiamento AP	
pT0	4 (16%)
pTis	1 (4%)
pT1	5 (20%)
pT2	3 (12%)
pT3	9 (36%)
pT4	3 (12%)
Linfonodos	
Ressecados	26,28 (\pm 11,9)
Acometidos	7 (28%)
Histologia Especial	9 (36%)
Escamosa	4(44,4%)
Sarcomatóide/rabdóide	2(22,2%)
Plasmocitóide	2(22,2%)
Micropapilar	1(11,1%)
Intervalos de tempo (dias)	
RTU > QT	89,36 (\pm 56,47)
QT > Cistectomia	58,07 (21,03)
Cistectomia > Óbito	734,54 (\pm 612,49)
Número de óbitos	16 (64%)

Sexo e idade não tiveram relação com resposta ao tratamento ($p=0,179$ e $p>0,999$, respectivamente). Dentre os pacientes que responderam ao tratamento, o esquema tratamento se deu com GC=4 (40%), GCT=4 (40%) e

MVAC=2 (20%). Dezesesseis (64%) pacientes morreram ao longo do seguimento, com um tempo de seguimento médio de 49,3 meses ($\pm 52,7$) após a cirurgia.

A expressão de CAIX foi maior em mulheres ($p=0,0169$). Todos os demais biomarcadores tiveram expressão similar em ambos os sexos. Em todos os biomarcadores analisados, não houve qualquer diferenciação na expressão IHQ quando se estratificou por grupos etários.

Diferenciação divergente ou variante histológica de CaUB estava presente em 9 (36%) pacientes (Figura 3). A forma encontrada mais comum foi Diferenciação Escamosa em 4 (44,4%) casos, seguida por padrão Sarcomatóide / Rabdóide em 2 (22,2%), Plasmocitóide 2 (22,2%) e Micropapilar em 1 (11,1%). Não houve resposta à QT em nenhum caso identificado com alguma destas variantes histológicas ($p=0,002$).

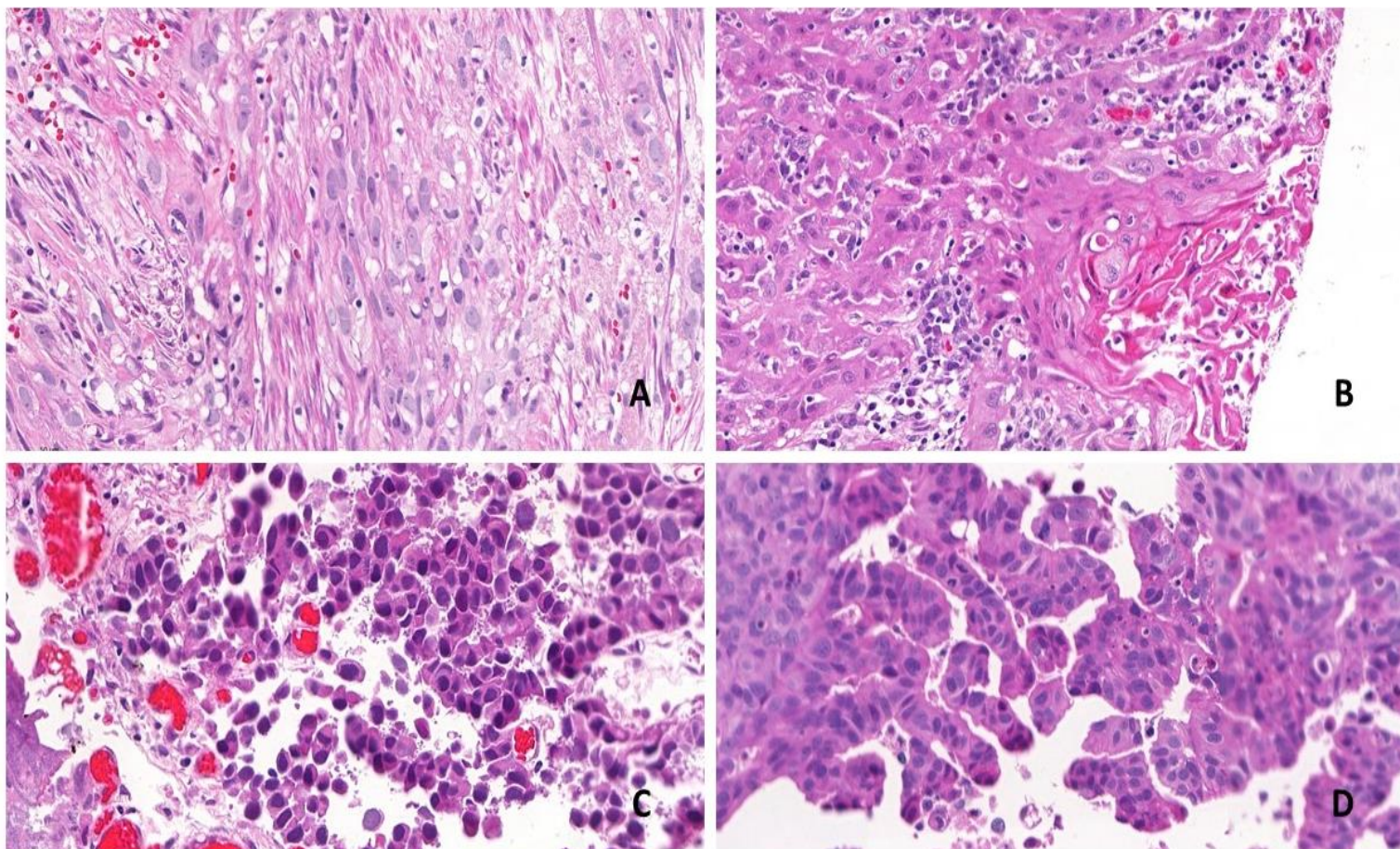


Figura 3. Variantes do CaUB: A: Sarcomatóide; B: Escamoso; C: Plasmocitóide e D: Micropapilar.

A Imunoexpressão das proteínas e suas respectivas respostas à QT estão expostas na tabela 4. Apenas a expressão de CAIX (figura 4A e 4B) foi relacionada a ausência de resposta. Dentre aqueles que não responderam, oito (53,5%) expressaram CAIX e todos os que tiveram CAIX expressa estão dentro o grupo de não-respondedores ($p=0,005$).

Tabela 4. Tabela de distribuição dos pacientes de acordo com o status de expressão dos Biomarcadores versus Resposta à QT.

Biomarcador	IHC	Resposta à QT		P
		Não (%)	Sim (%)	
CAIX	Negativo	7 (46,7)	10 (100)	0,005
	Positivo	8 (53,3)	0 (0)	
CK5/6	Negativo	9 (60)	3 (30)	0,226
	Positivo	6 (40)	7 (70)	
CK7	Negativo	5 (33,3)	1 (10)	0,181
	Positivo	10 (66,7)	9 (90)	
CK20	Negativo	7 (46,7)	3 (30)	0,405
	Positivo	8 (53,3)	7 (70)	
GATA3	Negativo	5 (33,3)	2 (20)	0,467
	Positivo	10 (66,7)	8 (80)	
Her2	Negativo	8 (53,3)	6 (60)	0,742
	Positivo	7 (46,7)	4 (40)	
EGFR	Negativo	10 (66,7)	8 (80)	0,467
	Positivo	5 (33,3)	2 (20)	
P63	Negativo	2 (13,3)	0 (0)	0,229
	Positivo	13 (86,7)	10 (100)	
P53	Negativo	8 (53,3)	4 (40)	0,513
	Positivo	7 (46,7)	6 (60)	
MLH1	Negativo	3 (20)	3 (30)	0,566
	Positivo	12 (80)	7 (70)	
MSH2	Negativo	3 (20)	4 (40)	0,275
	Positivo	12 (80)	6 (60)	
MSH6	Negativo	1 (6,7)	0 (0)	0,405
	Positivo	14 (93,3)	10 (100)	
PMS2	Negativo	4 (26,7)	4 (40)	0,484
	Positivo	11 (73,3)	6 (60)	

Em relação ao prognóstico, houve correlação entre perda de expressão de CK 5/6 e fatores prognósticos desfavoráveis. A perda de expressão de CK5/6

relacionou-se com presença de diferenciação divergente ($p=0,025$) e metástase linfonodal ($p=0,019$) (Figura 4C e 4D). Em relação ao evento óbito, a expressão do CK 5/6 apresentou um resultado marginal, próximo da significância estatística ($p=0,053$) (Tabela 5).

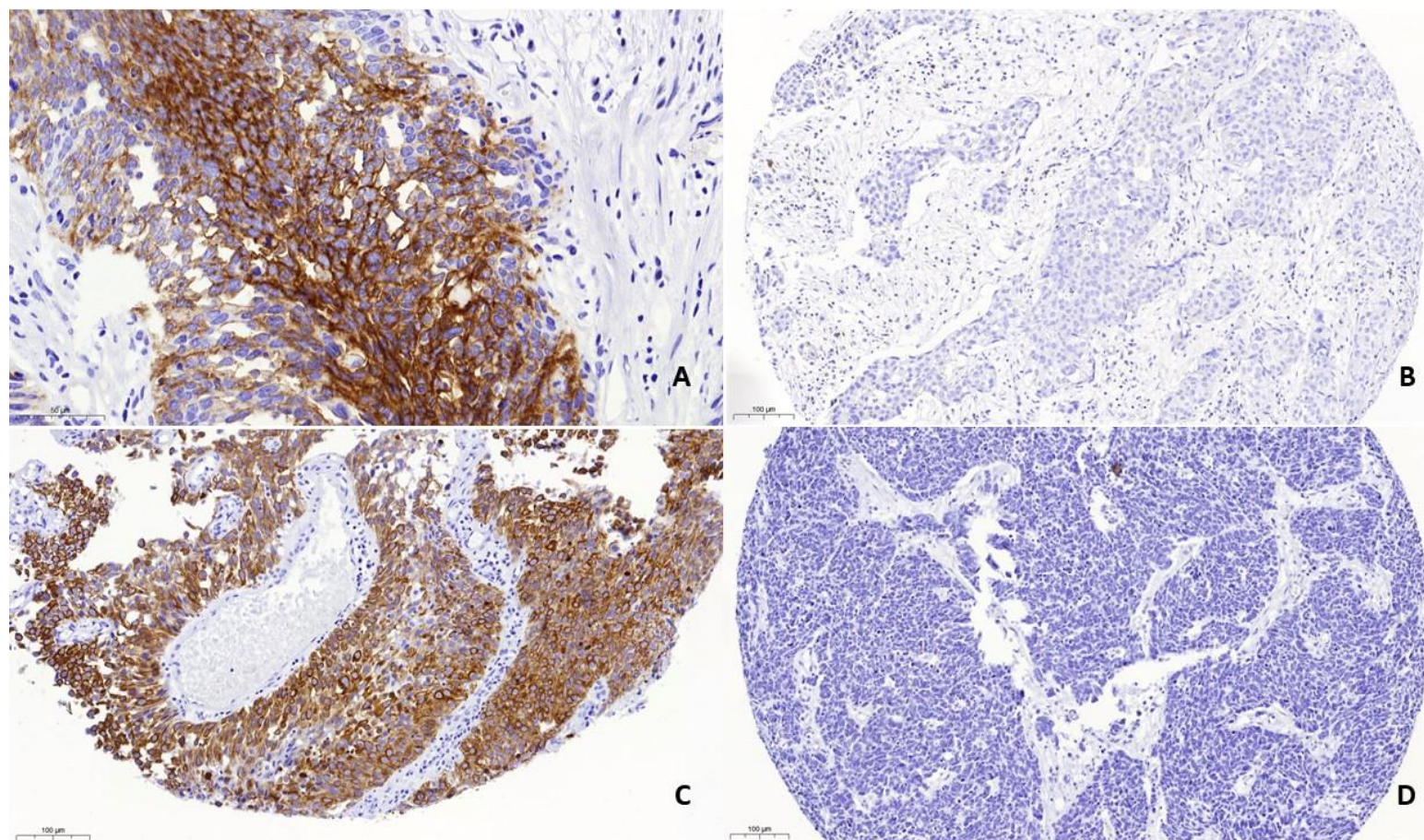


Figura 4. Imuno-expressão de CAIX positiva (A) e negativa (B). Imuno-expressão de CK5/6 positiva (C) e negativa (D).

Tabela 5. Tabela de distribuição dos pacientes de acordo com o status de expressão dos Biomarcadores versus Óbito.

Biomarcador	IHC	Óbito		P
		Não (%)	Sim (%)	
CAIX	Negativo	7 (77)	10 (62,5)	0,432
	Positivo	2 (23)	6 (37,5)	
CK5/6	Negativo	2 (23)	10 (62,5)	0,053
	Positivo	7 (77)	6 (37,5)	
CK7	Negativo	3 (33,3)	3 (18,7)	0,412
	Positivo	6 (66,7)	13 (81,3)	
CK20	Negativo	4 (44,4)	6 (37,5)	0,734
	Positivo	5 (55,6)	10 (62,5)	
GATA3	Negativo	3 (33,3)	4 (25)	0,656
	Positivo	6 (66,7)	12 (75)	
Her2	Negativo	6 (66,7)	8 (50)	0,420
	Positivo	3 (33,3)	8 (50)	
EGFR	Negativo	5 (55,6)	13 (81,2)	0,170
	Positivo	4 (44,4)	3 (18,8)	
P63	Negativo	0 (0)	2 (12,5)	0,269
	Positivo	9 (100)	14 (87,5)	
P53	Negativo	4 (44,4)	8 (50)	0,790
	Positivo	5 (55,6)	8 (50)	
MLH1	Negativo	3 (33,3)	3 (18,8)	0,412
	Positivo	6 (66,7)	13 (81,2)	
MSH2	Negativo	3 (33,3)	4 (25)	0,636
	Positivo	6 (66,7)	12 (75)	
MSH6	Negativo	0 (0)	1 (6,3)	0,444
	Positivo	9 (100)	15 (92,7)	
PMS2	Negativo	4 (44,4)	4 (25)	0,317
	Positivo	5 (55,6)	12 (75)	

Foi realizada a avaliação da sobrevida câncer-específica através de análises de Kaplan-Meier. A diferenciação divergente ($p=0,009$), a presença de metástase linfonodal ($p=0,015$) e a perda de expressão de CK5/6 ($p=0,035$) foram relacionadas a uma menor sobrevida (figura 5). Os demais biomarcadores analisados não apresentaram resultados que conferissem alteração na sobrevida ou óbito (tabela 5).

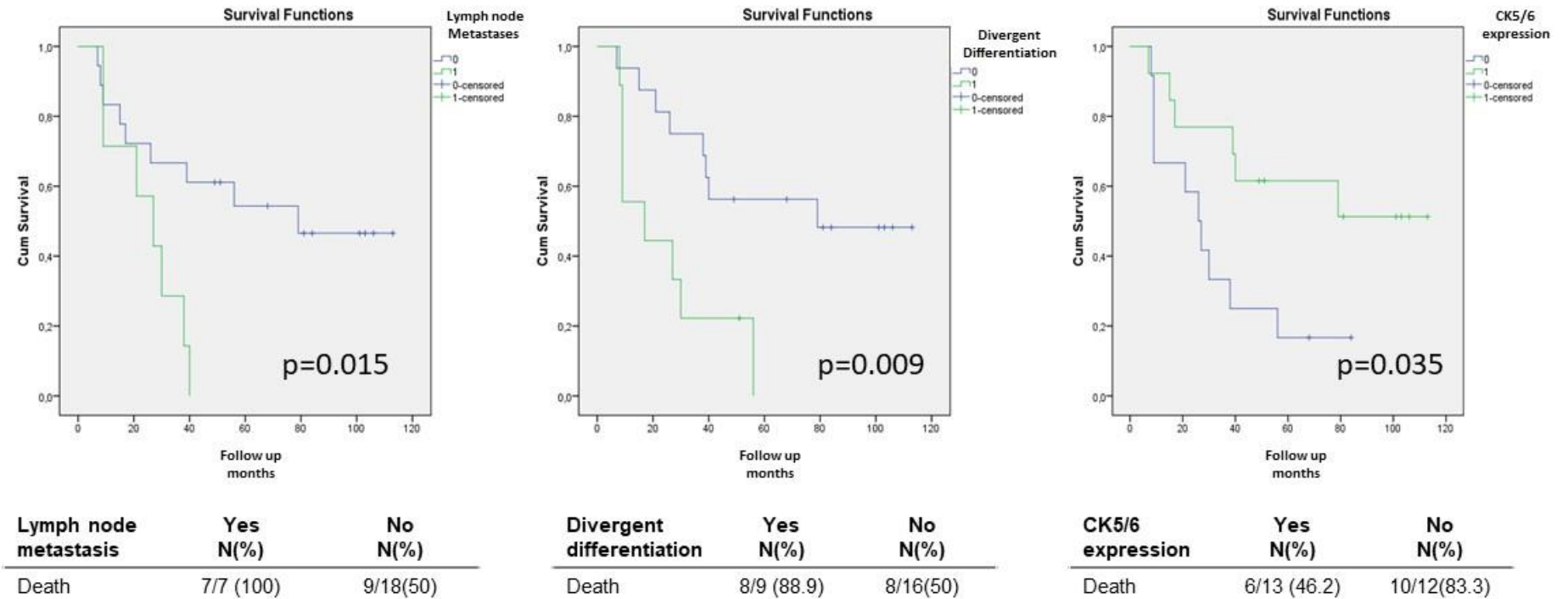


Figura 5. Curva de Kaplan-Meier mostra menor sobrevida câncer-específica relacionada à Metástase linfonodal, Diferenciação divergente e Perda de expressão de CK5/6.

O tempo de sobrevida médio foi de 24,6 meses (EP=6,6) (IC95%=11,7–37,5) para os pacientes que apresentaram diferenciação divergente, contra 72,5 meses (EP=10,6) (IC95%=15,5–34,2) para aqueles com CaUB padrão. A sobrevida média para pacientes com metástase linfonodal à CR foi 24,9 meses (EP=4,8) (IC95%=15,5–34,2) e 69,3 meses (EP=10,7) (IC95%=48,2–90,3) para os pacientes com linfonodos livres de doença. Aqueles que perderam a expressão da CK5/6 apresentaram tempo médio de sobrevida de 33,4 meses (EP=7,6) (IC95% 18,5-48,3) *versus* 75,1 meses para os pacientes que mantiveram a sua expressão (EP=12,0) (IC95% 51,7-98,6).

A resposta à QT alcançou uma significância estatística marginal na análise de sobrevida. Oitenta por cento dos pacientes que não responderam à QT vieram a óbito, enquanto 40% faleceram dentre os que responderam (p=0,053).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram alguns pontos importantes. O biomarcador CAIX esteve significativamente relacionado à não-resposta à QT neoadjuvante, não sendo encontrado nenhum caso de resposta quando CAIX esteve expressa na análise do espécime cirúrgico. Em segundo lugar, todos os pacientes com variante histológica (36%) também foram não-responsivos à QT. Adicionalmente, em relação a sobrevivência específica ao câncer (curva de Kaplan-Meier), a perda do biomarcador CK5/6, a variante histológica divergente e a metástase linfonodal se associaram à menor sobrevida câncer específica. Além disso, nossos resultados mostraram que oitenta por cento dos pacientes que não responderam à QT neoadjuvante morreram de câncer, enquanto isso ocorreu em 40% dos que responderam. A resposta à quimioterapia atingiu uma significância estatística marginal em relação à sobrevida, porém os resultados são muito relevantes do ponto de vista clínico.

5.1 Anidrase carbônica

A CAIX é uma isoenzima associada a tumores humanos (46) e são catalisadores largamente distribuídos em tecidos humanos, fazendo a conversão do dióxido de carbono em ácido carbônico. Geralmente biomarcadores relacionados a hipóxia, como a CAIX, tem sido alvo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de tumores (37) (46). A CAIX mantém a homeostase durante condições de hipóxia e sua imunoexpressão é um marcador de hipóxia, se relacionando a maior agressividade e quimiorresistência em

câncer de mama do tipo molecular basal (47). Estudos diversos demonstraram que, em muitos tipos de câncer, a alta expressão de CAIX é acompanhada de um fenótipo mais agressivo de tumor e a mau prognóstico (47). Esses estudos corroboram os nossos resultados.

Adicionalmente, a expressão da CAIX já foi descrita como um preditor de progressão e sobrevivência em câncer de bexiga e de mama, e também um marcador de resistência a quimioterapia (37) (47). Os autores sugerem que a agressividade do câncer pode estar associada a fenômenos de resistência à hipóxia local. KLATTE et al., 2009 avaliaram a expressão de CAIX em uma série de pacientes com CaUB. Identificaram a ausência de CAIX no tecido urotelial normal, enquanto 71% dos CaUB expressaram a enzima. Observaram também expressão diferencial em tumor invasivo em relação aos não-invasivos, sugerindo esse marcador como um forte preditor para a recorrência, progressão e sobrevida global para CaUB. Interessante que os autores observaram uma maior expressão da CAIX em tumores iniciais, não-invasivos (pTa), sugerindo o seu uso como marcador para o diagnóstico de CaUB em estágios iniciais. Sugerem a análise da expressão de CAIX associado à citologia urinária como método diagnóstico precoce.(37).

5.2 Citoqueratina 5/6

As citoqueratinas (CK) são proteínas encontradas no citoesqueleto dos tecidos epiteliais e ajudam as células a resistir ao estresse mecânico. A expressão dessas CK é específica para determinados órgãos ou tecidos. A CK

5/6 é normalmente encontrada no epitélio escamoso e carcinoma de células escamosas (CEC), em posição basal (48) (39). Nos casos de CaUB avançado, incluindo os de diferenciação escamosa ou não, a presença de CK 5/6 chega a 50% e está associada a pior prognóstico (38). A expressão positiva de CK 5/6 tem sido observada em 20% dos CaUB, associada ao grau de diferenciação e à invasão da camada muscular, entretanto sem influenciar os índices de recorrência e sobrevida (39).

CHOI et al. descreveram 2 tipos de CaUB músculo-invasivos à semelhança da mama. Classificaram em basais e luminais que por sua vez se subdividem em luminal e p53-like. Caracterizam-se por anormalidades genéticas específicas. Os basais envolvem alterações no EGFR, STAT3, HIF1 e genes relacionados a resposta imune, enquanto os tumores luminais relacionam-se com FGFR3, PPAR γ , ERBB2 e ERBB3 (49). Seguindo essas descobertas, e assumindo que a citoqueratina 5/6 identifica os tumores basais, esperaríamos uma resposta melhor à QT para tumores positivos para citoqueratina 5/6, mas não foi isso o que observamos em nosso estudo. Não houve relação entre a imunexpressão da citoqueratina 5/6 e o downstaging, mas houve uma relação com o prognóstico. A perda de citoqueratina 5/6, juntamente com metástases linfonodais e diferenciação divergente, foi relacionada a pior sobrevida ao câncer em nosso estudo.

O fato de encontrarmos uma associação da CK 5/6 correlacionada a diferenciação histológica divergente, metástase do nódulo linfático e menor sobrevida ao câncer, reforça o seu papel como biomarcador de CaUB do tipo basal. Os tumores basais são consistentemente mais agressivos quando

comparados aos tumores luminais e são associados a uma sobrevida significativamente mais curta do que os tumores luminais (50).

Embora vários estudos reportem uma relação entre expressão de genes relacionados ao reparo do tipo MMR, o fator de transcrição p53, os receptores da tirosina-quinase (EGFR e ERBB2) e o GATA 3 com resposta a QT neoadjuvante, nosso estudo não foi capaz de reproduzir tais achados. (51).

5.3 Variantes histológicas

Observamos a homogeneidade na falta de resposta dos tumores à QT nas amostras que apresentavam diferenciação histológica divergente. Mais de um terço dos nossos casos apresentou alguma variante histológica e nenhum dos pacientes com diferenciação escamosa, sarcomatóide/rabdóide, micropapilar ou plasmocitóide respondeu à QT. Pokuri et al. (49) relataram resultados semelhantes com uma resposta pT0 que foi 11 vezes maior para o carcinoma urotelial puro em relação aos tumores com variantes histológicas ou tumores mistos. De maneira similar, estudos recentes demonstraram que variantes histológicas em CaUB está associada a piores resultados oncológicos para pacientes com câncer de bexiga pT1 de alto grau do que aqueles uroteliais puros (52). A diferenciação divergente também mostrou um impacto na sobrevida câncer específica em nossa série: média de 24.6 meses versus 72.5 meses para o carcinoma urotelial puro.

Pacientes com variantes histológicas requerem observação cuidadosa e a CR imediata pode ser a melhor opção de tratamento, especialmente para os

que apresentam variante histológica do tipo escamosa. O achado de variantes histológicas em tumor de bexiga também aumenta a probabilidade de metástase (51), além de um risco aumentado de sub-estadiamento clínico e de doença metastática oculta. Levados em conjunto, é aparente que as variantes histológicas potencialmente levam a um mau prognóstico para CaUB músculo invasivo, não só no contexto de QT neoadjuvante, mas na história natural da doença como um todo.(53, 54)

5.4 Limitações

O nosso estudo apresenta limitações. Trata-se de um estudo retrospectivo e com um número de amostras pequeno. Um estudo randomizado, prospectivo e com um maior número de pacientes ajudaria a resolver diversas questões levantadas aqui.

Análises dos principais estudos clínicos randomizados mostraram que a falha em corrigir o estadiamento do câncer, os tipos de cirurgia e a seleção correta dos pacientes podem comprometer a capacidade de identificar fatores preditivos de resposta ao tratamento neoadjuvante (55). No entanto, apenas um subconjunto de pacientes com CaUB músculo invasivo se beneficiará de QT, e os que não respondem provavelmente sofrerão danos, de modo que os biomarcadores preditivos serão fundamentais para o uso personalizado do QT em um futuro próximo. Por enquanto, selecionar pacientes com base em características clínicas de alto risco (cT3–4a) pode ser uma abordagem para reduzir o tratamento excessivo no cenário neoadjuvante. Além disso, a

estratificação molecular de tumores por perfil de expressão gênica tem sido aplicada a um grande número de doenças malignas humanas e é uma grande promessa para o tratamento personalizado do CaUB (56).

Desse modo, o papel da imunoterapia neoadjuvante é promissor e está sendo investigado. Enquanto a medicina genômica de precisão promete transformar a prática clínica, a diversidade de classificações dos CaUB músculo invasivo já publicadas levou a um atraso na incorporação de subtipos de CaUB músculo invasivo tanto para os ensaios clínicos quanto para o manejo de pacientes com câncer de bexiga. Kamoun et al. (57) propõem tal consenso e fornece uma ferramenta para a aplicação da classificação desse consenso no ambiente clínico.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Demonstramos que a expressão imuno-histoquímica de CAIX e a diferenciação histológica divergente (variantes histológicas) são potenciais marcadores preditivos de resposta à QT neoadjuvante.

Essas informações são simples, baratas e podem ser usadas universalmente para a seleção de pacientes a serem submetidos ao tratamento neoadjuvante.

Nossos resultados requerem validação futura através de estudos prospectivos e com um maior número de pacientes.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo A - Aprovação do estudo no comitê de ética



São Paulo, 15 de março de 2017.

Registro: NP 1061/16

Ref. Solicitação de execução de estudo: **"Identificação de marcadores biomoleculares preditivos de resposta à quimioterapia Neoadjuvante no carcinoma urotelial de bexiga"**

Pesquisador Responsável: Katia Ramos Leite
Pesquisador Executor: Leonardo Lima Borges

CONSIDERAÇÕES

Objetivo é a identificação de marcadores moleculares de resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em cisplatina de carcinomas uroteliais de bexiga invasivos (pT2). Entre a 01/2009 e a 07/2016 384 pacientes foram submetidos a CR no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Neste período 52 pacientes receberam QT neoadjuvante baseada em cisplatina. Os espécimes cirúrgicos referentes à primeira intervenção diagnóstica (RTU do CaUB) desses pacientes serão objeto do estudo da expressão de genes. Será realizada uma análise retrospectiva da evolução dos pacientes portadores de CaUB tratados com QT neoadjuvante baseada em cisplatina. Serão identificados neste estudo os esquemas de tratamentos realizados, tais como as drogas quimioterápicas utilizadas, o número de ciclos, bem como a toxicidade associada a cada tratamento. Os intervalos de tempo entre a primeira RTU, a QT e a CR também serão consideradas para análise. Por fim, serão identificados os graus de resposta patológica.

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Antes do início das atividades relacionadas ao estudo:

- Apresentar a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da **FAMUSP** para execução no ICESP conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde;
- Enviar anualmente o status ou relatório do estudo. Projetos sem informações por mais de 1 ano serão cancelados automaticamente e impedirá a submissão de novos projetos pelos investigadores;
- Enviar resultados do projeto (publicações, defesa de tese, apresentação em congressos e outros);

Informamos que sua solicitação foi **DEFERIDA**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo M. Hall
Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo M. Hall
Diretor Geral
ICESP

Versão 1.2 11 de julho de 2016



Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

.....

BAIRRO: CIDADE:

.....

CEP: TELEFONE: (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES BIOMOLECULARES PREDITIVOS DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE NO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

2. PESQUISADOR : **Dra. Katia Ramos Moreira Leite**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico, setor uro-oncologia, setor de Patologia**

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 51.422

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de cirurgia, Departamento de Patologia, Clínica urológica

PESQUISADORES COLABORADORES: Leonardo Lima Borges CRM: 116.068

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO X RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

O objetivo deste estudo é identificar quais são os marcadores moleculares de resposta à quimioterapia neoadjuvante baseada em cisplatina de carcinomas uroteliais de bexiga invasivos ($\geq pT2$). Isto significa dizer que estamos procurando fatores que poderão nos ajudar quais pacientes deverão ir para quimioterapia antes da cirurgia e quais deverão ser operados de imediato. Você já foi submetido a este tratamento, estamos apenas pedindo que autorize a utilização para estudo do material retirado durante a sua cirurgia. Quaisquer dúvidas relativas à pesquisa poderão ser esclarecidas pelo(s) pesquisador(es) ou médicos do serviço de urologia em qualquer etapa do estudo.

A principal investigadora é a Dra. **Kátia Ramos Moreira Leite**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255- 7º andar sala 710-F, Telefone (011) 3069 – 8080.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel.: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.

O participante poderá a qualquer momento retirar seu consentimento e deixar de participar da pesquisa que está sendo desenvolvida, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Assim como terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

O estudo não exigirá qualquer despesa pessoal em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

É garantido o compromisso dos pesquisadores utilizarem os dados somente para esta pesquisa.

Acredito estar suficientemente claras as informações que li ou que foram para mim lidas, descrevendo o estudo: “**Identificação de marcadores biomoleculares preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante no carcinoma urotelial de bexiga**”. Eu discuti com a Prof. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente a participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido no atendimento nesta Instituição.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo C – Artigo submetido para revista Clinical Genitourinary Cancer

Clinical Genitourinary Cancer
Histological variants of urothelial carcinoma predict no response to neo-adjuvant chemotherapy
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Study
Keywords:	Muscle invasive bladder cancer; Neoadjuvant chemotherapy; Biomarkers; Carbonic anhydrase IX; immunohistochemistry; Histological variants
Corresponding Author:	Kaísa Leite Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina São Paulo, BRAZIL
First Author:	Kaísa Leite
Order of Authors:	Kaísa Leite Leonardo Lima Borges Leopoldo Ribeiro Filho Daher Chade Rafael Ferreira Coelho Maurício Cordeiro Miguel Srougi Willian Carlos Nahas
Abstract:	<p>Background</p> <p>Platinum-based neoadjuvant chemotherapy (NAC) in muscle-invasive urothelial bladder cancer (MIBC) has been adopted as a standard of care related to better survival outcomes. However, there is a considerable number of patients who do not respond, experiencing toxicity and delay in the surgical treatment. Our aim is to find biomarkers of response that could be easily adopted in the clinical practice.</p> <p>Methods</p> <p>Between Jan 2009 - Jul 2016, 52 patients with MIBC were submitted to radical cystectomy after NAC. A tissue microarray containing 25 cases, who met the inclusion criteria was built for immunohistochemical analysis of Cytokeratins 5/6, 7, and 20, GATA3, Her2, EGFR, p63, p53, Carbonic-anhydrase IX (CAIX), MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2. The surgery was performed in a mean time of 58.7 (\pm 21) days after the end of the NAC. Fisher's exact test was used to analyze the relationship between response (spT1) and histopathological and immunohistochemical results and Kaplan-Meier curves were designed for survival analysis.</p> <p>Results</p> <p>Ten (40.0%) patients presented response to NAC. Histological variants of the urothelial carcinoma characterized by squamous, sarcomatous/lymphoid, plasmocytoid and micropapillary was present in 36.0% and none responded to NAC ($p = 0.002$). CAIX was expressed by 53.3% and none responded to NAC ($p=0.005$). Lymph-node metastasis, divergent differentiation, and expression of cytokeratin 5/6 were related to short cancer specific survival.</p> <p>Conclusion</p> <p>Histological variants and CAIX immune-expression are biomarkers of non-response to NAC of MIBC, and might be easily used in the clinical practice to select patients to be submitted to surgery upfront.</p>

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
2. Kohler BA, Sherman RL, Howlader N, Jemal A, Ryerson AB, Henry KA, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6):djv048.
3. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmäng S, Lee R, Kim SP, Stenzl A, et al. The economics of bladder cancer: costs and considerations of caring for this disease. *Eur Urol*. 2014;66(2):253-62.
4. Pasin E, Josephson DY, Mitra AP, Cote RJ, Stein JP. Superficial bladder cancer: an update on etiology, molecular development, classification, and natural history. *Rev Urol*. 2008;10(1):31-43.
5. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, et al. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(9):859-66.
6. von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3068-77.
7. Collaboration ABCAM-a. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. *Eur Urol*. 2005;48(2):202-5; discussion 5-6.
8. Sternberg CN, Bellmunt J, Sonpavde G, Siefker-Radtke AO, Stadler WM, Bajorin DF, et al. ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Chemotherapy for urothelial carcinoma-neoadjuvant and adjuvant settings. *Eur Urol*. 2013;63(1):58-66.
9. Sfakianos JP, Galsky MD. Neoadjuvant chemotherapy in the management of muscle-invasive bladder cancer: bridging the gap between evidence and practice. *Urol Clin North Am*. 2015;42(2):181-7, viii.
10. Network CGAR. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*. 2014;507(7492):315-22.
11. Guo G, Sun X, Chen C, Wu S, Huang P, Li Z, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. *Nat Genet*. 2013;45(12):1459-63.
12. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N, Hanrahan AJ, Ostrovnaya I, Balar AV, et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(25):3133-40.
13. Ikeda S, Hansel DE, Kurzrock R. Beyond conventional chemotherapy: Emerging molecular targeted and immunotherapy strategies in urothelial carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(8):699-706.
14. Netto GJ. Molecular genetics and genomics progress in urothelial bladder cancer. *Semin Diagn Pathol*. 2013;30(4):313-20.
15. Choi W, Czerniak B, Ochoa A, Su X, Siefker-Radtke A, Dinney C, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2014;11(7):400-10.
16. Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G. p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol*. 1999;10(9):1011-21.
17. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749-58.

18. Fan S, Smith ML, Rivet DJ, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, et al. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res.* 1995;55(8):1649-54.
19. Fan S, el-Deiry WS, Bae I, Freeman J, Jondle D, Bhatia K, et al. p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res.* 1994;54(22):5824-30.
20. Cote RJ, Esrig D, Groshen S, Jones PA, Skinner DG. p53 and treatment of bladder cancer. *Nature.* 1997;385(6612):123-5.
21. Stadler WM, Lerner SP, Groshen S, Stein JP, Shi SR, Raghavan D, et al. Phase III study of molecularly targeted adjuvant therapy in locally advanced urothelial cancer of the bladder based on p53 status. *J Clin Oncol.* 2011;29(25):3443-9.
22. Dixon MJ, Marazita ML, Beaty TH, Murray JC. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):167-78.
23. Shiran MS, Tan GC, Sabariah AR, Rampal L, Phang KS. p63 as a complimentary basal cell specific marker to high molecular weight-cytokeratin in distinguishing prostatic carcinoma from benign prostatic lesions. *Med J Malaysia.* 2007;62(1):36-9.
24. Wang L, Zhou M, Feng C, Gao P, Ding G, Zhou Z, et al. Prognostic value of Ki67 and p63 expressions in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(4):495-501.
25. Karni-Schmidt O, Castillo-Martin M, Shen TH, HuaiShen T, Gladoun N, Domingo-Domenech J, et al. Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *Am J Pathol.* 2011;178(3):1350-60.
26. Choi W, Shah JB, Tran M, Svatek R, Marquis L, Lee IL, et al. p63 expression defines a lethal subset of muscle-invasive bladder cancers. *PLoS One.* 2012;7(1):e30206.
27. Marquis L, Tran M, Choi W, Lee IL, Huszar D, Siefker-Radtke A, et al. p63 expression correlates with sensitivity to the Eg5 inhibitor ZD4877 in bladder cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(7):477-86.
28. Mansour AM, Abdelrahim M, Laymon M, Elsherbeeney M, Sultan M, Shokeir A, et al. Epidermal growth factor expression as a predictor of chemotherapeutic resistance in muscle-invasive bladder cancer. *BMC Urol.* 2018;18(1):100.
29. Groenendijk FH, Fransen van de Putte EE, van Rhijn BW, Bernards R, van der Heijden MS. Reply to Eliezer M. Van Allen, Levi A. Garraway and Jonathan E. Rosenberg's Letter to the Editor re: Floris H. Groenendijk, Jeroen de Jong, Elisabeth E. Fransen van de Putte, et al. ERBB2 Mutations Characterize a Subgroup of Muscle-invasive Bladder Cancers with Excellent Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol.* In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.01.014>. *Eur Urol.* 2015;68(2):e33-4.
30. Lee V, Murphy A, Le DT, Diaz LA. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade. *Oncologist.* 2016;21(10):1200-11.
31. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol.* 2015;47(4):1189-202.
32. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372(26):2509-20.
33. Henrique R, Nunes SP, Jerónimo C. MSH2 Expression and Resistance to Cisplatin in Muscle-invasive Bladder Cancer: A Mix of Progress and Challenges. *Eur Urol.* 2019;75(2):251-2.
34. Goodspeed A, Jean A, Costello JC. A Whole-genome CRISPR Screen Identifies a Role of MSH2 in Cisplatin-mediated Cell Death in Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2019;75(2):242-50.
35. Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle.* 2004;3(2):164-7.

36. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol*. 2001;158(3):905-19.
37. Klatte T, Seligson DB, Rao JY, Yu H, de Martino M, Kawaoka K, et al. Carbonic anhydrase IX in bladder cancer: a diagnostic, prognostic, and therapeutic molecular marker. *Cancer*. 2009;115(7):1448-58.
38. Langner C, Wegscheider BJ, Rehak P, Ratschek M, Zigeuner R. Prognostic value of keratin subtyping in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch*. 2004;445(5):442-8.
39. Hashmi AA, Hussain ZF, Irfan M, Edhi MM, Kanwal S, Faridi N, et al. Cytokeratin 5/6 expression in bladder cancer: association with clinicopathologic parameters and prognosis. *BMC Res Notes*. 2018;11(1):207.
40. Hammam O, Wishahiz M, Khalil H, El Ganzouri H, Badawy M, Elkhquly A, et al. Expression of cytokeratin 7, 20, 14 in urothelial carcinoma and squamous cell carcinoma of the Egyptian urinary bladder cancer. *J Egypt Soc Parasitol*. 2014;44(3):733-40.
41. Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Miyamoto T, Sugaya K, Hosokawa H, Hasegawa A, et al. Essential role of GATA3 for the maintenance of type 2 helper T (Th2) cytokine production and chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci. *J Biol Chem*. 2004;279(26):26983-90.
42. Liang Y, Heitzman J, Kamat AM, Dinney CP, Czerniak B, Guo CC. Differential expression of GATA-3 in urothelial carcinoma variants. *Hum Pathol*. 2014;45(7):1466-72.
43. Miyamoto H, Izumi K, Yao JL, Li Y, Yang Q, McMahon LA, et al. GATA binding protein 3 is down-regulated in bladder cancer yet strong expression is an independent predictor of poor prognosis in invasive tumor. *Hum Pathol*. 2012;43(11):2033-40.
44. Inoue S, Mizushima T, Fujita K, Meliti A, Ide H, Yamaguchi S, et al. GATA3 immunohistochemistry in urothelial carcinoma of the upper urinary tract as a urothelial marker and a prognosticator. *Hum Pathol*. 2017;64:83-90.
45. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.
46. Opavský R, Pastoreková S, Zelník V, Gibadulinová A, Stanbridge EJ, Závada J, et al. Human MN/CA9 gene, a novel member of the carbonic anhydrase family: structure and exon to protein domain relationships. *Genomics*. 1996;33(3):480-7.
47. Tan EY, Yan M, Campo L, Han C, Takano E, Turley H, et al. The key hypoxia regulated gene CAIX is upregulated in basal-like breast tumours and is associated with resistance to chemotherapy. *Br J Cancer*. 2009;100(2):405-11.
48. Wang CC, Tsai YC, Jeng YM. Biological significance of GATA3, cytokeratin 20, cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221785.
49. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*. 2014;25(2):152-65.
50. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*. 2016;12:105-17.
51. Buttiglierio C, Tucci M, Vignani F, Scagliotti GV, Di Maio M. Molecular biomarkers to predict response to neoadjuvant chemotherapy for bladder cancer. *Cancer Treat Rev*. 2017;54:1-9.
52. Fujii N, Hoshii Y, Hirata H, Mori J, Shimizu K, Kobayashi K, et al. Impact of divergent differentiation in urothelial carcinoma on oncological outcome in patients with T1 high-grade bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2017;47(6):560-7.

53. Minato A, Fujimoto N, Kubo T. Squamous Differentiation Predicts Poor Response to Cisplatin-Based Chemotherapy and Unfavorable Prognosis in Urothelial Carcinoma of the Urinary Bladder. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(6):e1063-e7.
54. Vetterlein MW, Wankowicz SAM, Seisen T, Lander R, Löppenber B, Chun FK, et al. Neoadjuvant chemotherapy prior to radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer with variant histology. *Cancer*. 2017;123(22):4346-55.
55. Hermans TJN, Voskuilen CS, van der Heijden MS, Schmitz-Dräger BJ, Kassouf W, Seiler R, et al. Neoadjuvant treatment for muscle-invasive bladder cancer: The past, the present, and the future. *Urol Oncol*. 2018;36(9):413-22.
56. Aine M, Eriksson P, Liedberg F, Sjödaahl G, Höglund M. Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes. *Sci Rep*. 2015;5:10957.
57. Kamoun A, de Reyniès A, Allory Y, Sjödaahl G, Robertson AG, Seiler R, et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. 2020;77(4):420-33.