

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE
METALOPROTEINASES DE MATRIZ EM
CARCINOMAS UROTELIAIS DA BEXIGA,
INVASIVOS OU NÃO, COM FOCO NA SUA
DETERMINAÇÃO NO FRONTE DE INVASÃO**

STEPHANIA MARTINS BEZERRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Isabela Werneck da Cunha

Co-Orientador: Dr. Gustavo Cardoso Guimarães

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Bezerra, Stephania Martins

Avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz em carcinomas uroteliais da bexiga, invasivos ou não, com foco na sua determinação no frente de invasão / Stephania Martins Bezerra - São Paulo, 2015.

57p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA BEXIGA URINÁRIA; 2. METALOPROTEINASES DA MATRIZ; 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4.CARCINOMA DE CÉLULAS DE TRANSIÇÃO

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Fernando Cesar, minha mãe Larisa, meu irmão Fernando Filho, minha irmã Thais e meu marido Felipe, por me apoiarem sempre, incondicionalmente.

À minha orientadora Dra. Isabela Werneck da Cunha por todo o apoio, ajuda, paciência e incentivo na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, chefe e exemplo de patologista, sem dúvida o maior patologista do Brasil de todos os tempos.

Ao meu ilustre e querido avô e padrinho, Oswaldo Evandro Carneiro Martins (*in memoriam*), pelo exemplo de inteligência e caráter.

Aos meus colegas patologistas do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, Cynthia, Luis, Victor, Mariana, Vassallo, Hugo, Clóvis, Nascimento, Dirlei, Louise e Patricia, pela compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, por ter submetido o projeto para a FAPESP e tornar possível sua realização.

Ao Severino da Silva Ferreira e Carlos Ferreira Nascimento, pela colaboração em realizar os cortes histológicos para os estudos imunoistoquímicos.

À Marina França de Resende, pelo auxílio com a realização dos estudos imunoistoquímicos.

Ao Vinícius Calsavara, pela realização das análises estatísticas.

À Thais Safranov, pela cooperação na obtenção dos dados clínicos dos pacientes.

À Luciana Schultz e Gilce Damm, por toda a cooperação e envolvimento com este trabalho.

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, pela cooperação com as análises estatísticas.

À Biblioteca do A.C. Camargo Cancer Center, especialmente à Suely Francisco, pela formatação do trabalho e pela cooperação na obtenção de referências bibliográficas.

À Pós Graduação da Fundação Antônio Prudente, pela organização e apoio.

A todos os funcionários e residentes do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center.

Aos colegas de residência médica, em especial Marcos, Karina, Eduardo, André, Carlos, Sabrina, Mariana, Juliana e Sheila, pela amizade e ensinamentos nos primeiros anos de contato com a anatomia patológica.

Aos colegas da pós graduação, Deusdedit Cortez Vieira da Silva Neto, Eduardo Bertolli, Alexandre Balieiro, pela ajuda mútua nas disciplinas cursadas.

Às Sras. Luciana Pitombeira, Vanusa Rodrigues de Oliveira, Carla Cristina Brito de Barros e Ana Maria Kuninari pela ajuda e orientação.

Aos meus tios Cecy e Guilherme, Mayra, Luiz, e tia Beth, por me acolherem no seio de sua família durante os anos da faculdade de medicina.

Aos colegas de faculdade Edison Pedroso, Martha Sanjad, Patrícia Helena, Álvaro Muto, Claudio Tiego, Thaíla Soares, por tudo o que passamos juntos durante a faculdade de medicina.

Às amigas de toda a vida Priscila, Emmanuelle, Cira, Verdiane, pela amizade ao longo dos anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

Ao AC Camargo Câncer Center e Fundação Antônio Prudente, por mais uma vez estar fazendo parte da minha formação profissional.

À Universidade do Estado do Pará, por todos os anos vividos nesta instituição, pelo aprendizado e pela formação em medicina.

RESUMO

Bezerra SM. **Avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz em carcinomas uroteliais da bexiga, invasivos ou não, com foco na sua determinação no fronte de invasão.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O estudo de metaloproteinases de matriz (MMPs) em neoplasias é um campo do conhecimento que tem sido explorado cada vez mais, devido aos potenciais alvos terapêuticos associados. Uma maior compreensão da expressão de MMPs, os seus perfis de atividade e suas inter-relações é necessário para que elas possam ser úteis como agentes terapêuticos anticancerígenos e auxiliem na batalha contra o câncer. Até o momento, em carcinomas uroteliais de bexiga, os trabalhos de expressão imunoistoquímica de MMPs se restringem a avaliação isoladamente nos diversos compartimentos tumorais, não avaliando possíveis diferenças de expressão entre as células não invasoras superficiais, as células do centro da lesão e as células do fronte de invasão, bem como sua associação com estadios patológicos. Esta avaliação integrada é de fundamental importância para se compreender o fenômeno de invasão nestes tumores. **Material e métodos:** Foi realizado estudo imunoistoquímico das MMPs 1, 2, 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 16 em 50 carcinomas uroteliais invasivos (T2 ou maior) e esta expressão contabilizada de acordo com o compartimento tumoral (superfície, centro e fronte de invasão). Para estes casos, foi calculado o índice de concordância entre estes compartimentos. Adicionalmente, realizou-se estudo imunoistoquímico das MMPs 2, 9, 10, 15 e 16 em 85 tumores não músculo invasivos. **Resultados:** A avaliação da expressão imunoistoquímica das MMPs em carcinomas uroteliais mostrou que o perfil de expressão para tumores Ta e T1 é uma alta expressão de MMP-2, MMP-10, MMP-15 e MMP-16 e uma baixa expressão de MMP-9; tumores T2 têm uma alta expressão de MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16 e uma baixa expressão de MMP-9; tumores T3 têm uma alta expressão de MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16 e uma baixa expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13; tumores T4 têm uma alta expressão de

MMP-1, MMP-12, MMP-14, MMP-15 e MMP-16 e uma baixa expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13. O índice de concordância entre as expressões no fronte de invasão, superfície tumoral e centro da neoplasia foi variável entre as MMPs. **Conclusão:** Foi estabelecido um perfil de expressão de MMPs em carcinomas uroteliais. O índice de concordância entre expressão no fronte de invasão e demais compartimentos tumorais foi variável entre as MMPs e entre os estádios patológicos. Algumas MMPs, como MMP-2 e MMP-10, apresentaram expressão apenas nos estágios iniciais das neoplasias (Ta e T1), enquanto que outras, como MMP-15 e MMP-16, encontraram-se hiperexpressas em todos os estádios tumorais. A MMP-9, por sua vez, foi hipoexpressa desde os tumores iniciais até os tumores avançados e a MMP-12 mostrou alta expressão apenas em tumores T4. O melhor entendimento deste balanço biológico é importante no entendimento da carcinogênese dos tumores vesicais e pode servir de substrato para a descoberta de marcadores biológicos que podem ser utilizados tanto com finalidade diagnóstica quanto como possíveis alvos terapêuticos.

SUMMARY

Bezerra SM. [Matrix metalloproteinase expression assessment in invasive and non invasive urothelial carcinoma of the bladder, focusing on their determination in the invasive front]. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado Fundação Antônio Prudente].

Background: The study of matrix metalloproteinases (MMPs) in malignancies is a field of knowledge that has been increasingly explored due to potential therapeutic targets associated. A greater understanding of MMP expression, their activity profiles, and their interrelationships is necessary so that they can be useful as anti-cancer therapeutic agents and assist in the battle against cancer. To date, studies involving immunohistochemical expression of MMPs in urothelial carcinoma of the bladder are restricted to isolated assessment in different tumor compartments. There's no evaluation of the expression among non-invasive surface cells, cells of the center of the lesion and cells of the invasive front, as well as its correlation with pathologic stages. This integrated assessment is of fundamental importance for better understanding the process of invasion in these tumors. Immunohistochemical study of MMPs 1, 2, 9, 10, 12, 13, 14, 15 and 16 was performed in 50 invasive urothelial carcinomas (T2 or worse), and the expression was assessed according to the tumor compartment (surface, center and front of invasion). For these cases, it was calculated the rate of agreement between these compartments. In addition, immunohistochemistry of MMPs 2, 9, 10, 15 and 16 was performed in 85 non-invasive tumors. **Results:** The evaluation of the immunohistochemical expression of MMPs in urothelial carcinomas showed that the expression profile is as follows: Ta and T1 tumors have a high expression of MMP-2, MMP-10, MMP-15 and MMP-16; and a low MMP-9 expression. T2 tumors have a high expression of MMP-1, MMP-14, MMP-15 and MMP-16; and a low MMP-9 expression. T3 tumors have a high expression of MMP-1, MMP-14, MMP-15 and MMP-16; and a low expression of MMP-2, MMP-9, MMP-10 and MMP-13. T4 tumors have a high expression of MMP-1, MMP-12, MMP-14, MMP-15 and MMP-16; and a low expression of MMP-

2, MMP-9, MMP-10 and MMP-13. The agreement rate among expression in invasive front, tumor surface and center of the tumor was variable between MMPs.

Conclusion: A MMP expression profile was established in urothelial carcinomas. The agreement rate between expression in invasive front and other tumor compartments was variable among MMPs and among pathological stages. MMP-2 and MMP-10 were hyperexpressed only in early tumors (Ta and T1), while MMP-15 and MMP-16 were ubiquitously hyperexpressed. MMP-9 showed hypoexpression since early tumors through advanced ones and MMP-12 was hyperexpressed only in stage T4 tumors. The better understanding of these biological events is crucial for the comprehension of the bladder cancer oncogenesis and can provide information regarding molecular markers that can be used for diagnostic and prognostic purposes, as well as for targeted therapies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias de patogênese dos carcinomas uroteliais.....	3
Figura 2	Substratos e estrutura das MMPs.....	8
Figura 3	Avaliação da intensidade de expressão imunoistoquímica das metaloproteinases de matriz.....	17
Figura 4	Perfil de expressão de MMPs em 60 casos de carcinomas uroteliais papilíferos não invasivos (Ta), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.....	23
Figura 5	Perfil de expressão de MMPs em 20 casos de carcinomas uroteliais invasivos em lâmina própria (T1), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.....	25
Figura 6	Perfil de expressão de MMPs em 11 casos de carcinomas uroteliais invasivos em camada muscular própria (T2), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.....	28
Figura 7	Perfil de expressão de MMPs em 24 casos de carcinomas uroteliais invasivos em tecido perivesical (T3), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.....	31
Figura 8	Perfil de expressão de MMPs em 17 casos de carcinomas uroteliais invasivos em órgãos ou estruturas adjacentes (T4), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.....	35
Figura 9	Perfil de expressão imunoistoquímica das metaloproteinases de matriz, de acordo com o estágio patológico.....	37

Figura 10	Imagens representativas das reações imunoistoquímicas (MMP-1 MMP-2 MMP-9 MMP-10).....	38
Figura 11	Imagens representativas das reações imunoistoquímicas. (MMP-12 MMP-13 MMP-14 MMP-15 MMP-16).....	39

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação dos tumores de bexiga de acordo com a profundidade de invasão.....	14
Quadro 2	Anticorpos primários para ensaios de imunoistoquímica, suas fontes comerciais, clones, código no catálogo e diluição correspondentes...	15
Quadro 3	Avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados nos carcinomas uroteliais invasivos em camada muscular própria (T2).....	29
Quadro 4	Avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados nos carcinomas uroteliais invasivos em tecido perivesical (T3).....	32
Quadro 5	Avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados nos carcinomas uroteliais invasivos em órgãos ou estruturas adjacentes (T4).....	36
Tabela 1	Dados demográficos dos 135 pacientes estudados.....	19
Tabela 2	Distribuição dos 135 pacientes estudados de acordo com o estadiamento patológico.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMs	A disintegrin and metalloproteinase; adamalysins
ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif
AJCC	American Joint Committee on Cancer
FGFR-3	Fibroblast growth factor receptor 3
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
Ig	Imunoglobulina
kDa	Kilodaltons
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-3	Metaloproteinase de matriz 3
MMP-7	Metaloproteinase de matriz 7
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MMP-10	Metaloproteinase de matriz 10
MMP-11	Metaloproteinase de matriz 11
MMP-12	Metaloproteinase de matriz 12
MMP-13	Metaloproteinase de matriz 13
MMP-14	Metaloproteinase de matriz 14
MMP-15	Metaloproteinase de matriz 15
MMP-16	Metaloproteinase de matriz 16
MMP-17	Metaloproteinase de matriz 17
MMP-23	Metaloproteinase de matriz 23
MMP-25	Metaloproteinase de matriz 25
MMP-28	Metaloproteinase de matriz 28
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MT-MMPs	Metaloproteinases de matriz do tipo membrana
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RTU	Ressecção transuretral
UICC	International Union Against Cancer

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia do Carcinoma Urotelial	1
1.2	Vias Biológicas dos Carcinomas Uroteliais	1
1.3	Carcinoma Urotelial e Metástase	4
1.4	Matriz Extracelular	4
1.5	Metaloproteinases de Matriz.....	6
1.6	Metaloproteinases de Matriz e Carcinoma Urotelial	9
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1	Casuística	13
3.1.1	CrITÉRIOS de Inclusão	13
3.1.2	CrITÉRIOS de Exclusão	14
3.2	Método	14
3.2.1	Reações Imunoistoquímicas	14
3.2.2	Avaliação das Lâminas	16
3.2.3	Interpretação dos Resultados e Análise Estatística.....	17
3.3	Comitê de Ética.....	18
3.4	Financiamento.....	18
4	RESULTADOS	19
4.1	Delineamento da População de Estudo.....	19
4.2	Avaliação da Expressão Imunoistoquímica	20
4.2.1	Nos pacientes com Carcinoma <i>In Situ</i> (Tis).....	20
4.2.2	Nos pacientes com Carcinoma Urotelial Papilífero não Invasivo (Ta)	21
4.2.3	Nos pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Lâmina Própria (T1).....	23

4.2.4	Nos pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Camada Muscular própria (T2).....	25
4.2.5	Nos Pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Tecido Perivesical (T3).	29
4.2.6	Nos Pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Órgãos ou Estruturas Adjacentes (T4).....	32
4.3	Perfil de Expressão das MMPS de Acordo com o Estadio Patológico.....	37
5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÕES	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA UROTELIAL

O carcinoma de bexiga é a malignidade mais comum do sistema urinário. O carcinoma urotelial é o tipo histológico predominante nos Estados Unidos e Europa, responsável por mais de 90% de todos os cânceres de bexiga (JEMAL et al. 2011). No Brasil, esperava-se 6.750 casos novos de câncer de bexiga em homens e 2.190 em mulheres, em 2014. Esses valores correspondem a um risco estimado de 6,89 casos novos a cada 100 mil homens e 2,15 a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2014). Estudos com carcinoma urotelial de bexiga identificaram múltiplos fatores de risco, sendo os mais importantes o tabagismo e exposições ocupacionais (JEMAL et al. 2011).

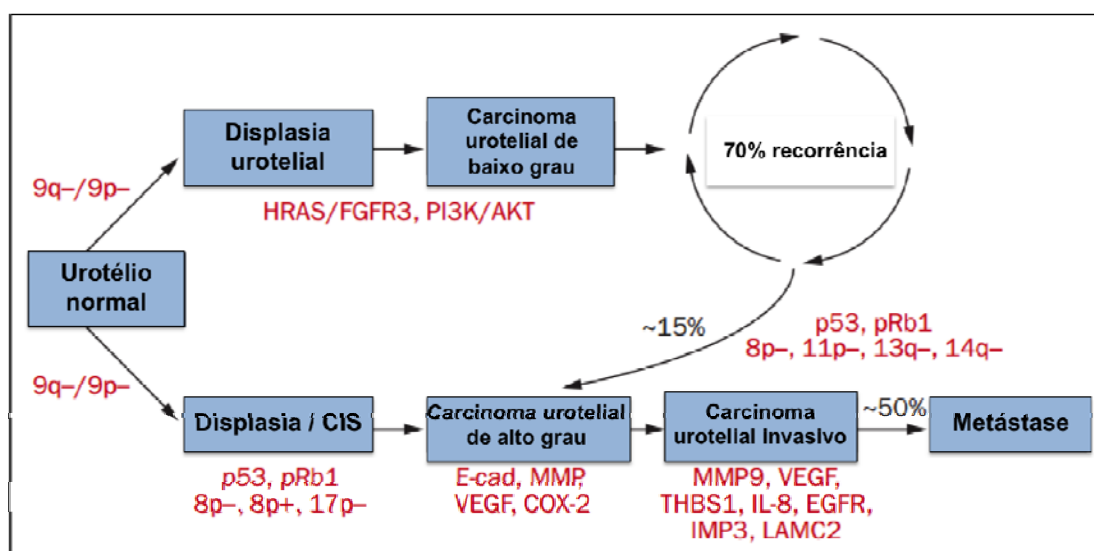
1.2 VIAS BIOLÓGICAS DOS CARCINOMAS UROTELIAIS

É bem reconhecido que tumores uroteliais humanos se desenvolvem por duas vias biológicas independentes, mas que em determinado momento podem se sobrepor. São as chamadas via papilífera e via não papilífera (ou sólida). Os tumores papilíferos correspondem a cerca de 80% das neoplasias uroteliais, se originam de alterações hiperplásicas, são tipicamente de baixo grau histológico e crescem como protruções papilares superficiais não-invasivas. Estes tumores têm uma alta propensão a recorrência, mas dificilmente invadem a parede vesical ou causam

metástases. Os tumores sólidos não-papilíferos são responsáveis por cerca de 20% das neoplasias uroteliais, se desenvolvem a partir de displasia severa ou carcinoma *in situ*. A maioria dos tumores não papilíferos de alto grau se desenvolvem em pacientes sem uma história prévia de tumores papilíferos. Carcinomas sólidos de alto grau invadem a parede vesical e podem dar origem a metástases em linfonodos regionais e órgãos distantes. Alguns dos tumores papilíferos superficiais de baixo grau, cerca de 10 a 15%, podem eventualmente progredir para Carcinomas invasivos de alto grau. Esta progressão é geralmente precedida pelo desenvolvimento de carcinoma *in situ* na mucosa vesical adjacente ou dentro do tumor papilífero (SPIESS e CZERNIAK 2006; CHAN et al. 2009; WU 2009). Ambos os tipos de neoplasia são considerados problemas de saúde pública, por diferentes razões. Tumores papilíferos usualmente não são ameaçadores à vida, mas devido à sua alta taxa de recorrência, levam o câncer de bexiga ao posto de mais caro em termos de manejo clínico. Já os tumores invasivos são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade. Embora cerca de metade dos tumores músculo-invasivos inicialmente respondam a regimes quimioterápicos baseados em cisplatina, o desenvolvimento de resistência a droga é um grande problema, e a progressão da doença em tumores resistentes é rápida e fatal. Grandes esforços estão sendo realizados, principalmente através do entendimento da biologia tumoral, na tentativa de prevenir a recorrência dos tumores papilíferos, bem como a progressão do carcinoma *in situ* e dos tumores não musculo-invasivos para tumores músculo-invasivos (CHAN et al. 2009; MCCONKEY et al. 2010).

Com relação às alterações moleculares de cada via, a via de patogênese dos carcinoma uroteliais papilíferos superficiais é primariamente baseada em alterações

no receptor tirosina quinase FGFR-3 e no oncogene *HRAS* (OXFORD e THEODORESCU 2003). A via de patogênese para carcinomas uroteliais músculo-invasivos primariamente envolve alterações nos genes supressores de tumor *p53*, *p16* e *Rb* (KUBOTA et al. 1995; WU 2005; MITRA et al. 2006). Conforme ilustrado na Figura 1, alterações no *p53* e *Rb* também são necessárias para a progressão do subgrupo de lesões superficiais que evoluem para carcinomas uroteliais de alto grau músculo-invasivos (NETTO 2013).



Fonte: Adaptado de NETTO (2013)

Figura 1 - Vias de patogênese dos carcinomas uroteliais.

A identificação de mecanismos moleculares que mediam invasão e metástase é de suma importância para pacientes que se apresentam com formas invasivas de câncer vesical. É esperado que o entendimento da biologia da neoplasia possibilite a identificação de marcadores biológicos que possam ser utilizados para auxiliar o manejo clínico da doença.

1.3 CARCINOMA UROTELIAL E METÁSTASE

A disseminação metastática tumoral é a principal causa de morte relacionada ao câncer. A formação das metástases é um processo multifatorial pelo qual células tumorais individuais se destacam do tumor primário, ultrapassam a membrana basal e invadem o estroma vizinho. Esta etapa é seguida pela invasão das células tumorais em vasos linfáticos ou sanguíneos, alcançando a circulação e posteriormente, outros órgãos distantes. Neste momento, estas células devem deixar a circulação e migrar para dentro do tecido ao redor, onde elas geram seu próprio estroma a partir do estroma pré-existente. Estas etapas requerem adaptação dinâmica das células tumorais a diferentes microambientes, incluindo vários tipos de matriz extracelular. Portanto, as interações tumor-matriz extracelular são muito importantes não só na formação tumoral, como também na progressão das neoplasias, tanto loco-regionais quanto metastáticas (WALLARD et al. 2006).

1.4 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular é uma estrutura tridimensional, não celular, que está presente em todos os tecidos e é essencial para a vida. Cada órgão possui uma matriz extracelular com uma composição única, e que é gerada em estágios embrionários iniciais. A função da matriz extracelular vai além de prover um suporte físico para a integridade e elasticidade tecidual. Ela é uma estrutura dinâmica que está em constante remodelamento para controlar a homeostase tecidual (HYNES 2009). A importância funcional da matriz extracelular pode ser ilustrada pela ampla gama de

defeitos teciduais ou, em casos graves, pela morte de embriões causada por mutações em genes que codificam componentes da matriz extracelular (JÄRVELÄINEN et al. 2009; BATEMAN et al. 2009).

Em mamíferos, a matriz extracelular é composta por cerca de 300 proteínas, incluindo proteínas como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (HYNES e NABA 2012). Existem dois tipos principais de matriz extracelular que diferem no que se refere à sua localização e composição: a matriz de tecido conjuntivo intersticial, que envolve as células e proporciona uma armação estrutural para os tecidos; e a membrana basal, que é uma forma especializada de matriz extracelular que separa o epitélio do estroma circundante (BONNANS et al. 2014). Os componentes da matriz extracelular constantemente interagem com as células epiteliais servindo como ligantes para receptores celulares, como integrinas, transmitindo sinais que regulam a adesão, migração, proliferação, apoptose, sobrevivência ou diferenciação. A matriz extracelular também pode sequestrar e liberar localmente fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos, e outras moléculas de sinalização. Componentes da matriz extracelular liberados após sua degradação também regulam a arquitetura dessa matriz e influenciam no comportamento das células (HYNES 2009). Além disso, as células estão constantemente reconstruindo e remodelando a matriz extracelular através da síntese, degradação, remontagem e modificação química. Estes processos são complexos e precisam ser estritamente regulados para manter a homeostase do tecido, especialmente em resposta a lesões. O remodelamento desregulado da matriz extracelular está associado a condições

patológicas e pode exacerbar a progressão de doenças, como o câncer (FRANTZ et al. 2010).

A degradação dos componentes da matriz extracelular é o processo principal durante o seu remodelamento, e é importante para a regulação da sua composição e estrutura, assim como para a liberação de moléculas biologicamente ativas. A matriz extracelular pode ser degradada por diferentes famílias de proteases e dentro desse grupo destacam-se as metaloproteinases de matriz (BONNANS et al. 2014).

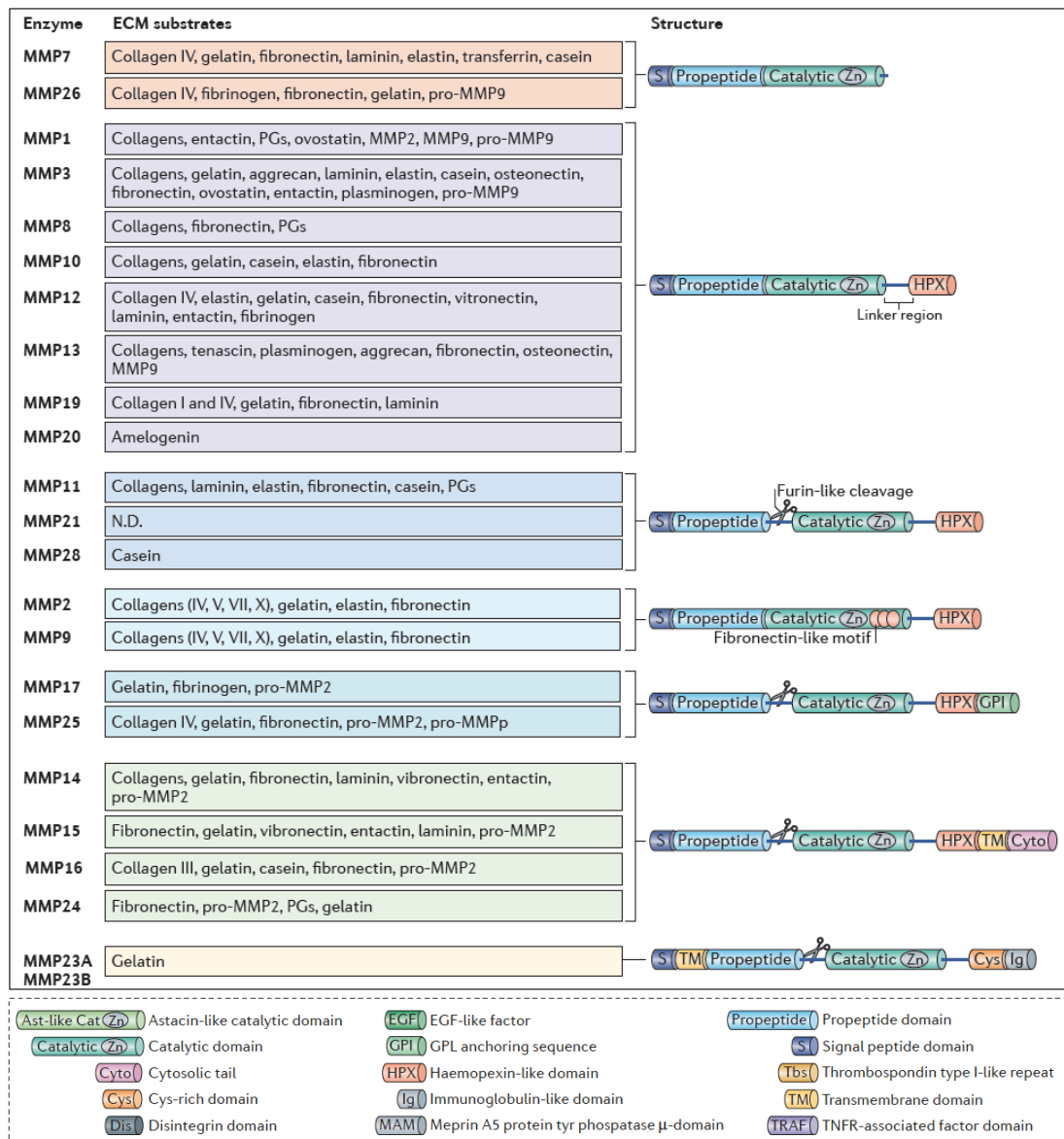
1.5 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

As metaloproteinases foram descobertas em 1962 em um estudo de remodelamento do colágeno durante a metamorfose da cauda de girinos (GROSS e LAPIERE 1962). Até agora, foram identificadas 23 metaloproteinases humanas. A maioria das metaloproteinases são secretadas como zimogênios, e são ativadas subsequentemente no espaço extracelular. A ativação das metaloproteinases primariamente ocorre por via de clivagem proteolítica (por proteases serínicas ou outras metaloproteinases) ou pela modificação do grupo tiol por oxidação (por exemplo, através de espécies reativas de oxigênio geradas por leucócitos). Em conjunto, as metaloproteinases podem degradar todas as proteínas da matriz extracelular (LU et al. 2011).

As metaloproteinases pertencem à família de enzimas metzincinas, que inclui as metaloproteinases de matriz (MMPs), adamalinas (que inclui ADAMs e ADAMTS) e astacinas (incluindo meprinas). Elas são enzimas multidomínio que contêm o motivo HEXXHXXGXXH altamente conservado (onde X é qualquer

aminoácido), no qual três resíduos de histidinas (His) se ligam a um íon de zinco no local catalítico. As metaloproteinases são produzidas tanto como enzimas solúveis como ancoradas à membrana que clivam os componentes da matriz extracelular. MMPs são compostas por vários domínios funcionais partilhados: domínio peptídeo, domínio propeptídeo, domínio catalítico e domínio hemopexina-like (exceto MMP-7, MMP-23 e MMP-26). O domínio peptídeo de sinal amino-terminal é necessário para a secreção de MMPs. O domínio de propeptídeo contém o motivo interruptor de cisteína PRCGXPD. O domínio catalítico (que tem uma atividade proteolítica) contém o motivo de ligação de zinco; o resíduo de cisteína neste local interage com o íon zinco, que mantém a pro-MMP inativa até que o domínio de propeptídeo seja removido. O domínio hemopexina-like carboxi-terminal, que está presente em quase todas as MMPs, está envolvido na especificidade para o substrato e nas funções não proteolíticas de MMPs. MMPs do tipo membrana (MT-MMPs), tais como MMP-14, estão ancoradas à superfície celular por qualquer domínio transmembrana, seguido por uma cauda citoplasmática curta ou um glicosilfosfatidilinositol (GPI) de sequência. Algumas MMPs, incluindo MT-MMPs, MMP-11, MMP-17, MMP-21, MMP-23, MMP-25 e MMP-28, podem ser ativadas pela furina convertase, que cliva o propeptídeo de precursores inativos no aparelho de Golgi, para liberar proteínas funcionais. A MMP-23 contém um domínio de imunoglobulina (Ig), que é única entre os MMPs. Este domínio de Ig facilita as interações proteína-proteína ou proteína-lipídeo, semelhante ao domínio hemopexina de outras MMPs. A Figura 2 ilustra a estrutura e os alvos das MMPs (BONNANS et al. 2014). Estas interações entre MMPs e matriz extracelular participam do processo de invasão tecidual,

crescimento e metástase de diversas neoplasias, incluindo o carcinoma urotelial (SZARVAS et al. 2011).



Fonte: BONNANS et al. (2014)

Figura 2 - Substratos e estrutura das MMPs.

1.6 METALOPROTEINASES DE MATRIZ E CARCINOMA UROTELIAL

O envolvimento de MMPs em processos celulares que auxiliam na formação tumoral, como adesão celular, angiogênese tumoral, proliferação celular, transição epitélio-mesênquima e apoptose, fazem delas candidatos atraentes a marcadores biológicos e alvos para terapia. Por conta disso, esforços têm sido feitos para avaliar seu papel prognóstico, diagnóstico e terapêutico em câncer vesical. Embora a maioria das MMPs tenham sido estudadas em câncer de bexiga, apenas MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 o foram de forma extensiva (SZARVAS et al. 2011).

OZDEMIR et al. (1999) e NAKOPOULOU et al. (2001) estudaram, por expressão imunoistoquímica, a MMP-1, e observaram que sua expressão aumentada estava associada a tumores de estágio clínico mais avançado e maior grau histológico.

Atividade de MMP-2 em carcinomas uroteliais foi estudada por zimografia e mostrou associação com estágio clínico dos pacientes (DAVIES et al. 1993; MOHAMMAD et al. 2010). Resultados semelhantes encontraram VASALA et al. (2003), utilizando método de imunoistoquímica, e KANAYAMA et al. (1998), que por sua vez utilizaram RT-PCR. Entretanto, GRIGNON et al. (1996), também utilizando a técnica de imunoistoquímica, verificaram ausência de associação da expressão deste marcador com estágio clínico dos pacientes.

Com relação à MMP-9, diversos estudos utilizando zimografia, imunoistoquímica e Northern blot, mostraram resultados divergentes com relação à

associação com estágio clínico dos pacientes e grau patológico da neoplasia (DAVIES et al. 1993; GRIGNON et al. 1996; OZDEMIR et al. 1999).

REIS et al., em 2012, analisaram os níveis de expressão de MMP-2, MMP-9 e MMP-14 pelo método de reação de cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) em amostras teciduais congeladas de pacientes com carcinoma urotelial submetidos a ressecção transuretral de bexiga. Eles verificaram que MMP-9 estava superexpressa em 59% dos pacientes e MMP-2 e MMP-14 eram subexpressas na maioria dos pacientes. Além disso, constataram que a MMP-9 era mais expressa em tumores recorrentes, e em tumores invasivos, quando comparada a tumores superficiais.

Estes estudos com MMPs em carcinomas uroteliais de bexiga encontraram resultados controversos, o que pode ser atribuído a diversos fatores, como diferentes metodologias empregadas, tumores de diversos estadios e amostragem tumoral (TMAs, superficial, profundo). Adicionalmente, nenhum destes estudos avaliou a expressão de MMPs nos diversos compartimentos tumorais, e estudos realizados em outras neoplasias já demonstraram a expressão diferenciada de MMPs no fronte de invasão tumoral.

Neste contexto, SOARES et al. em 2006, demonstraram que em carcinomas epidermóides de pênis, os tumores menos diferenciados, mais invasivos e com um padrão de infiltração em pequenos blocos celulares, são associados com uma maior expressão de MMP-2 e MMP-9, avaliadas no fronte de invasão tumoral (SOARES et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2006).

Desta forma, até o momento, em carcinomas uroteliais de bexiga, os trabalhos de expressão de MMPs que utilizaram o método imunoistoquímico não permitem

avaliar as diferenças de expressão entre as células não invasoras superficiais, as células do centro da lesão, e as célula do fronte de invasão, bem como sua associação com estadios patológicos. Além disso, estes estudos realizados não permitem a caracterização de um perfil de expressão de MMPs por estadio patológico, pois realizaram somente a avaliação isolada de uma ou poucas MMPs em carcinomas uroteliais de bexiga.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão imunoistoquímica de metaloproteinases de matriz em carcinomas uroteliais de bexiga.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Analisar a expressão imunoistoquímica de metaloproteinases 1, 2, 9, 10, 12, 13, 14, 15 e 16 em carcinomas uroteliais da bexiga, não invasivos e invasivos, com foco no fronte de invasão tumoral.
- b. Caracterizar o perfil de expressão destes marcadores, de acordo com o estadiamento patológico de cada neoplasia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram recuperados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, lâminas e blocos de parafina contendo tecido neoplásico de pacientes submetidos à ressecção cirúrgica de tumores de bexiga, através de ressecção transuretral por via cistoscópica (RTU) ou cistectomia radical, realizadas nesta mesma instituição, no período de 2000 a 2010. Cada caso foi revisado por dois patologistas para confirmação diagnóstica, classificação e seleção dos blocos de parafina a serem utilizados. O estadiamento patológico se baseou na classificação de tumores uroteliais do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e do *International Union Against Cancer* (UICC) (Quadro 1). Foi criado um banco de dados destes pacientes, contendo informações relacionadas a dados demográficos, antecedentes mórbidos, tipo de tratamento e terapias prévias, achados dos exames endoscópicos, presença de recorrência/progressão da doença, complicações do tratamento e dados do seguimento de todos os pacientes.

3.1.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo os casos com confirmação do diagnóstico de Carcinoma urotelial de bexiga cujos blocos de parafina estavam disponíveis.

3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos de tumores invasivos em que havia representação inadequada da camada muscular própria para estadiamento patológico confiável.

Quadro 1 - Classificação dos tumores de bexiga de acordo com a profundidade de invasão.

TNM	Descrição
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Tumor papilífero não invasivo
T1	Tumor invade a lâmina própria
T2	Tumor invade a camada muscular própria
T3	Tumor invade o tecido perivesical
T4	Tumor invade órgãos e estruturas adjacentes

Fonte: SOBIN et al. (2012)

3.2 MÉTODO

3.2.1 Reações Imunoistoquímicas

Os anticorpos utilizados neste estudo estão especificados no Quadro 2. Primeiramente eles foram testados e as reações de imunoistoquímica padronizadas de acordo com a melhor diluição, recuperação antigênica, método de detecção e revelação.

Quadro 2 - Anticorpos primários para ensaios de imunoistoquímica, suas fontes comerciais, clones, código no catálogo e diluição correspondentes.

Anticorpo	Fonte comercial	Clone	Catálogo	Diluição
MMP-1	Neomarkers	Policlonal	rb9225P	1/200
MMP-2	Neomarkers	Policlonal	rb9233P	1/100
MMP-9	Neomarkers	Policlonal	rb9234P	1/400
MMP-10	Neomarkers	Policlonal	rb9235	1/200
MMP-12	Abcam	Policlonal	ab5734-75	1/200
MMP-13	Neomarkers	Clone Ab-1	ms-825-P1	1/50
MMP-14	Neomarkers	Policlonal	rb9254-P1	1/100
MMP-15	Neomarkers	Policlonal	rb9280-P1	1/600
MMP-16	Neomarkers	Policlonal	rb1547-P1	1/50

Para a realização do estudo imunoistoquímico, foram realizados cortes histológicos de 4 µm de espessura dos blocos de parafina selecionados. As lâminas preparadas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi reidratado em soluções decrescentes de etanol e as lâminas lavadas em água. A recuperação antigênica é um processo que aumenta a reatividade e foi realizada por tratamento com calor na presença de uma solução recuperante com pH alto ou baixo. Após a recuperação antigênica, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio.

Após a incubação com anticorpo primário, foi utilizado o sistema de detecção polimérico, revelação com 3,3' – diaminobenzidina (DAB), contracoloração com hematoxilina e montagem das lâminas. Todas as reações foram realizadas acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado.

3.2.2 Avaliação das Lâminas

Cada anticorpo foi avaliado por um patologista ao microscópio óptico e categorizado quanto à intensidade da marcação (0, ausente; 1+, fraca; 2+, moderada; 3+, forte), em cada região do tumor (superfície, centro da neoplasia, frente de invasão, e células estromais ao redor da neoplasia) no citoplasma das células de interesse. Imagens representativas da avaliação realizada são ilustradas na Figura 3.

Foi considerado superfície da neoplasia as células tumorais mais superficiais representadas no corte histológico avaliado, em contato com a luz do órgão, tanto em tumores invasivos, como em tumores não invasivos.

Foi considerado o centro da neoplasia o grupo de células que não está em contato com a luz do órgão, tanto em tumores invasivos, como em tumores não invasivos.

O frente de invasão foi avaliado somente nos casos de tumores invasivos, (T1, T2, T3 e T4), sendo considerado como as células neoplásicas que estão situadas mais profundamente no corte histológico avaliado, isto é, mais distantes da superfície do tumor, em contato direto com o estroma circunjacente.

As células estromais avaliadas foram aquelas em contato direto com o frente de invasão da neoplasia, no caso dos tumores invasivos, ou aquelas em contato direto com a membrana basal das lesões não invasivas.

A avaliação de MMP-1, MMP-12, MMP-13 e MMP-14 não foi realizada nos pacientes dos estádios Tis, Ta e T1, devido a pequena representação da neoplasia em uma parte dos casos selecionados para o estudo.

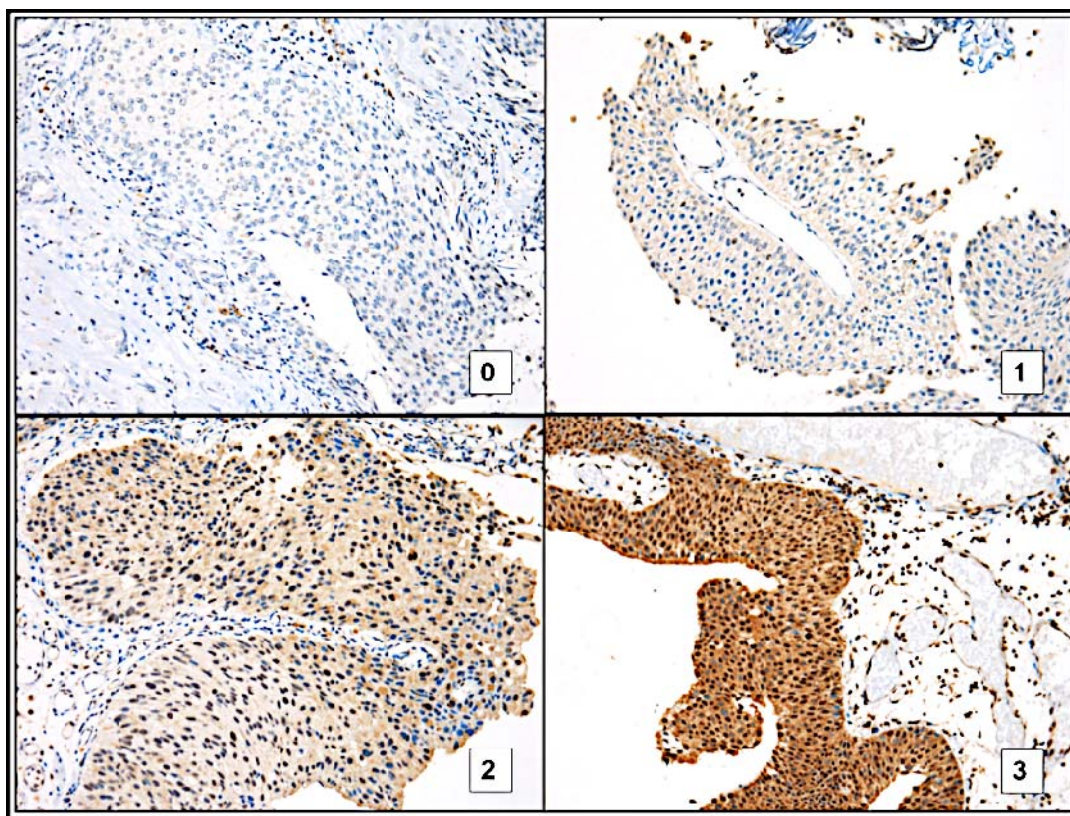


Figura 3 - Avaliação da intensidade de expressão imunoistoquímica das metaloproteinases de matriz. 0 – ausência de marcação, 1 – intensidade fraca, 2 – intensidade moderada, 3 – intensidade forte.

3.2.3 Interpretação dos Resultados e Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da avaliação das lâminas foram anotados em planilhas do programa Microsoft Excel. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 18.0. Para a determinação do perfil de expressão dos marcadores nos diferentes estadios estudados, foi utilizado o teste de Cochran, com correção de Bonferroni, no qual todos os marcadores estudados foram comparados entre si, e verificado se a diferença de expressão entre eles era estatisticamente significativa. Para determinação do grau de concordância de expressão dos marcadores entre o fronte de invasão e os demais compartimentos tumorais avaliados (centro e superfície), foi utilizado o

coeficiente de concordância Kappa. Os resultados considerados estatisticamente significativos foram aqueles com índice de rejeição da hipótese de nulidade (p) menor que 0,05.

3.3 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center/SP na data 11/09/2012 sob o número 97.724. (Anexo 1)

3.4 FINANCIAMENTO

Este projeto obteve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Número do projeto 2012/20232-0.

4 RESULTADOS

4.1 DELINEAMENTO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Cento e trinta e cinco casos de carcinomas uroteliais foram elegíveis para o estudo, seguindo os critérios descritos anteriormente. Dos 135 pacientes estudados, 85 foram submetidos à ressecção transuretral de bexiga, e 50 a cistectomias radicais.

Com relação aos dados demográficos, a maior parte dos pacientes estudados encontrava-se na sétima década de vida ou mais no momento do diagnóstico, a maioria de raça branca, do sexo masculino e eram tabagistas ou ex-tabagistas, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Dados demográficos dos 135 pacientes estudados.

<i>Variável</i>	<i>Categorias</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Idade ao diagnóstico	<40 anos	3	2,2
	41-60 anos	50	36,07
	>61 anos	82	60,74
Raça	Branco	78	57,7
	Outros	57	42,3
Sexo	Masculino	86	63,7
	Feminino	49	36,2
Tabagismo	Sim	47	34,8
	Ex-tabagista	52	38,5
	Não	25	18,5
	Ignorado	11	8,1

Com relação ao estadiamento anátomo-patológico, a maioria dos pacientes apresentou-se com tumor papilífero não invasivo (Ta – 60 pacientes), seguidos por aqueles que exibiam tumores invasivos em tecido adiposo perivesical (T3 – 24 pacientes). A distribuição de todos os pacientes do estudo de acordo com seu estadiamento anátomo-patológico pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos 135 pacientes estudados de acordo com o estadiamento patológico.

<i>Variável</i>	<i>Categorias</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
Estadio patológico	Tis	3	2,2
	Ta	60	44,4
	T1	20	14,8
	T2	11	8,1
	T3	24	17,8
	T4	17	12,6
TOTAL		135	100

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA

4.2.1 Nos Pacientes com Carcinoma *In Situ* (TIS)

Com relação aos 3 pacientes com carcinoma *in situ*, a expressão da MMP-2 demonstrou ser igual em toda a neoplasia, dentro de cada caso, sendo que um caso exibiu expressão intensa, outro expressão moderada e o terceiro, expressão fraca. Nenhum dos três casos mostrou positividade nas células estromais ao redor do tumor.

A expressão de MMP-9 foi ausente nos três casos de carcinoma *in situ*, em todos os compartimentos neoplásicos avaliados e nas células estromais ao redor do tumor.

A expressão de MMP-10 mostrou-se ser semelhante (fraca) nos três casos de carcinoma *in situ* estudados, em toda a lesão. Nestes casos, a expressão de MMP-10 foi ausente nas células estromais que circundam a neoplasia.

Em relação à MMP-15, um caso exibiu expressão imunoistoquímica forte, e os outros dois mostraram expressão moderada. Os três casos não exibiram positividade para este marcador nas células estromais próximas à neoplasia.

A expressão de MMP-16 foi fraca em um dos casos de pacientes com carcinoma *in situ*, e moderada nos outros dois casos. Nos três casos, não houve expressão de MMP-16 nas células estromais ao redor da neoplasia.

Não foi realizada análise estatística nos casos de carcinoma urotelial *in situ* devido o pequeno número de casos incluídos neste grupo, impossibilitando esta avaliação.

4.2.2 Nos Pacientes com Carcinoma Papilífero Não-Invasivo (Ta)

A Figura 4 mostra que na maioria dos pacientes com tumores papilíferos não invasivos (Ta), a expressão de MMP-2 esteve presente, ainda que uma grande parte com expressão fraca (42 casos na superfície tumoral e 39 no centro da neoplasia). Treze casos exibiram marcação moderada (dez casos) ou forte (três casos) nas referidas topografias de lesão. Somente cinco casos (na superfície do tumor) e oito casos (no centro da neoplasia), dentre os 60 casos estudados neste grupo, não demonstraram positividade para esse marcador. Esta expressão aumentada neste grupo de pacientes foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparada à expressão de MMP-9. Em nenhuma das MMPs estudadas nestes pacientes houve expressão imunoistoquímica positiva nas células estromais que circundam a lesão.

A MMP-9 não pôde ser avaliada em um caso deste grupo devido ao desgaste do material presente no bloco de parafina. De maneira geral, esta metaloproteinase foi pouco expressa neste grupo de pacientes, sendo esta menor expressão estatisticamente significativa quando comparada às demais MMPs estudadas neste grupo ($p < 0,0001$). Ela mostrou-se negativa (47 casos) ou fracamente positiva (12 casos) em todos os pacientes estudados, seja na superfície da neoplasia, como em áreas mais centrais. Nenhum caso demonstrou expressão moderada ou forte deste marcador.

Semelhante à MMP-2, a MMP-10 também mostrou-se expressa na maioria dos pacientes deste grupo. Dos 60 casos estudados, 54 demonstraram alguma expressão deste marcador na superfície e no centro da neoplasia. Esta expressão aumentada também foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparada à MMP-9.

Tanto a MMP-15 como a MMP-16 também mostraram expressão imunoistoquímica aumentada nestes pacientes ($p < 0,0001$). Todos os 60 casos pertencentes a este grupo demonstraram alguma expressão destes marcadores. Com relação à MMP-15, a expressão na superfície tumoral foi forte em 39 casos, moderada em 19 casos e fraca em dois casos. A MMP-16 mostrou-se fortemente positiva em cinco casos, moderadamente positiva em 37 casos e fracamente positiva em 18 casos.

Em resumo, o perfil de expressão de MMPs em carcinomas uroteliais papilíferos não-invasivos (Ta) demonstrou uma expressão aumentada de MMP-2, MMP-10, MMP-15 e MMP-16, e uma baixa expressão de MMP-9, todos estes achados com significância estatística.

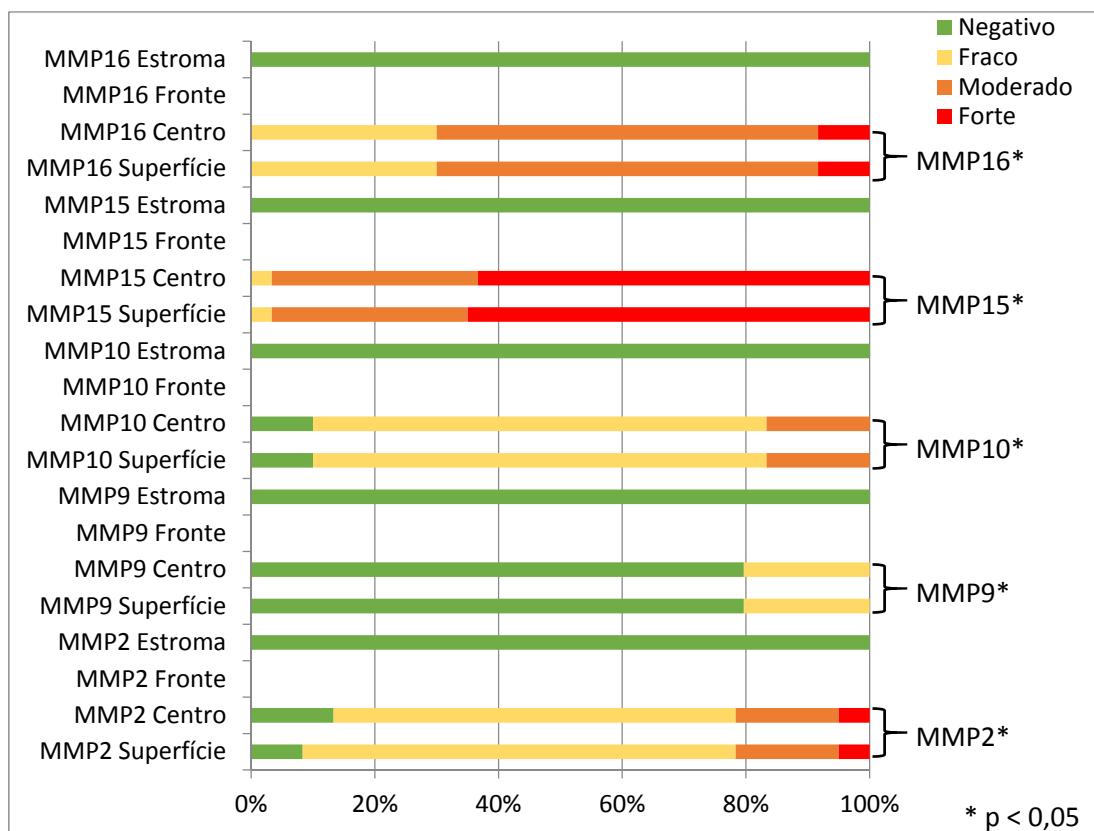


Figura 4 - Perfil de expressão de MMPs em 60 casos de carcinomas uroteliais papilíferos não invasivos (Ta), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.

4.2.3 Nos Pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Lâmina Própria (T1)

Devido ao desgaste da região invasiva do tumor presente no bloco de parafina, a avaliação do fronte de invasão das MMPs estudadas neste grupo de pacientes foi prejudicada em nove casos. Além disso, devido à artefatos pré-analíticos, a avaliação de MMP-10 e MMP-15 não foi realizada em um caso.

A Figura 5 mostra a expressão de MMPs nos carcinomas uroteliais invasivos em lâmina própria. Observa-se que, com relação à expressão de MMP-2, 19 dos 20 casos estudados demonstrou positividade para este marcador, na superfície e no centro da neoplasia, e 10 casos no fronte de invasão. Esta expressão aumentada foi

estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quando comparada à MMP-9.

Não houve expressão positiva de MMP-9 em nenhum caso estudado de pacientes com carcinomas uroteliais superficialmente invasivos, sendo esta baixa expressão significativamente menor que as outras MMPs estudadas neste grupo ($p < 0,0001$).

MMP-10 foi positiva em 15 dos 19 casos estudados neste grupo de pacientes, na superfície e centro da neoplasia, e em 12 casos no fronte de invasão. Esta expressão foi considerada aumentada em relação à MMP-9, com significância estatística ($p < 0,0001$).

Com relação à MMP-15 e MMP-16, a maioria dos casos neste grupo de pacientes demonstrou alguma positividade para estes marcadores, exceto nas células estromais ao redor da neoplasia ($p < 0,0001$). MMP-15 foi positiva forte ou moderada em 18 dos 20 pacientes (em superfície e centro das neoplasias), e em 15 pacientes no fronte de invasão. MMP-16 mostrou-se positiva em 19 dos 20 casos em superfície tumoral, nove destes de maneira moderada e 10 de forma fraca.

Em resumo, semelhante ao observado nos casos de pacientes portadores de carcinomas uroteliais papilíferos não-invasivos (Ta), o perfil de expressão de MMPs em carcinomas uroteliais invasivos em lâmina própria (T1) demonstrou uma expressão aumentada de MMP-2, MMP-10, MMP-15 e MMP-16, e uma baixa expressão de MMP-9, todos estes achados com significância estatística.

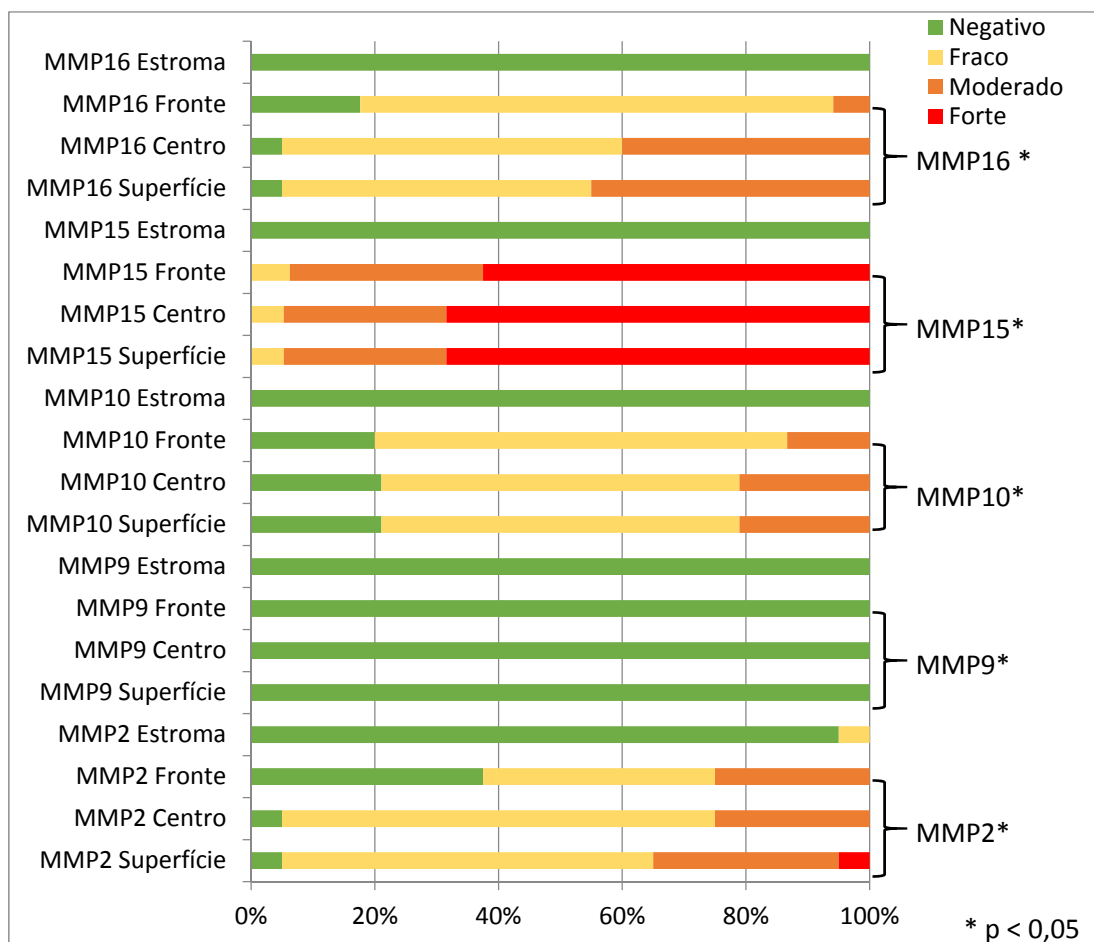


Figura 5 - Perfil de expressão de MMPs em 20 casos de carcinomas uroteliais invasivos em lâmina própria (T1), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.

4.2.4 Nos Pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Camada Muscular Própria (T2)

A Figura 6 mostra o perfil de expressão das metaloproteinases nos 11 pacientes com carcinoma urotelial invasivo em camada muscular própria (T2). Devido a artefatos pré-analíticos, a avaliação de MMP-1, MMP-12, MMP-13 e MMP-14 não foi realizada em um caso deste grupo. Observa-se que a MMP-1 mostrou algum grau de positividade em todos os casos estudados neste grupo de pacientes, sendo que a superfície tumoral mostrou intensidade maior (forte em seis casos) em relação à áreas mais profundas da lesão (intensidade forte em dois casos

no centro da neoplasia e em um caso no fronte de invasão). Esta positividade, de maneira global, foi estatisticamente significativa ($p = 0,0047$). Células estromais ao redor da neoplasia também demonstraram positividade para este marcador (moderada em um caso e fraca nos nove casos restantes).

A MMP-2 mostrou ausência de expressão ou expressão fraca na maior parte dos casos neste grupo de pacientes. Esta ausência de expressão/expressão fraca não foi estatisticamente significativa se comparada às outras metaloproteinases. Somente um caso demonstrou positividade moderada na superfície tumoral, no centro e no fronte de invasão. Todos os casos foram negativos nas células estromais ao redor da neoplasia.

Achados semelhantes foram observados em relação às MMP-9, MMP-10, MMP-12 e MMP-13. Com relação à MMP-9, somente um caso foi positivo moderado na superfície tumoral. Todos os outros casos e em todas as outras topografias, a positividade é ou ausente ou fraca, com significância estatística ($p = 0,0027$). De forma semelhante em relação à baixa expressão, porém, sem significância estatística, a MMP-10 não foi positiva forte ou moderada em nenhum caso, sendo, em todos os casos neste grupo de pacientes, sua expressão ou ausente ou fracamente positiva. Em relação à expressão de MMP-12, apesar de a positividade nas células neoplásicas ter sido negativa ou fraca em quase todos os casos estudados, todas as células estromais ao redor da neoplasia exibiram alguma positividade, seja ela moderada (em quatro casos) ou fraca (em seis casos), porém, sem demonstrar diferença estatisticamente significativa em relação às outras MMPs. A MMP-13 mostrou ausência de positividade na grande maioria dos casos, exibindo positividade

fraca em somente um caso na superfície tumoral e em dois casos no fronte de invasão, sem significância estatística.

A expressão de MMP-14 nestes pacientes mostrou-se maior que MMP-9, MMP-10, MMP-12 e MMP-13, estatisticamente significante ($p = 0,0047$), na medida em que a maior parte dos casos exibiu alguma positividade para este marcador, conforme observado na Figura 6, muito embora em nenhum dos casos a expressão tenha sido forte. Já a MMP-15 mostrou uma expressão positiva na maior parte dos casos ($p = 0,0027$), sendo que em dois casos, a expressão na superfície do tumor foi forte. Somente um caso mostrou ausência de expressão na superfície e centro das células neoplásicas, neste grupo de pacientes. Em relação à MMP-16, a expressão foi ainda mais intensa ($p = 0,0027$). Nenhum dos casos foi negativo para este marcador, sendo que em sete dos 11 casos estudados a expressão foi forte (três casos), ou moderada (quatro casos), na superfície tumoral. Em nove casos a expressão no fronte de invasão foi fraca, e em um caso, moderada. A maior parte dos casos foi fracamente positiva nas células estromais ao redor da neoplasia.

Em resumo, o perfil de expressão de MMPs em carcinomas uroteliais invasivos em camada muscular própria (T2) demonstrou uma expressão aumentada de MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16, e uma baixa expressão de MMP-9, todos estes achados com significância estatística.

Para a avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados em tumores T2, foi utilizado o coeficiente de concordância Kappa, cujos resultados podem ser vistos no Quadro 3.

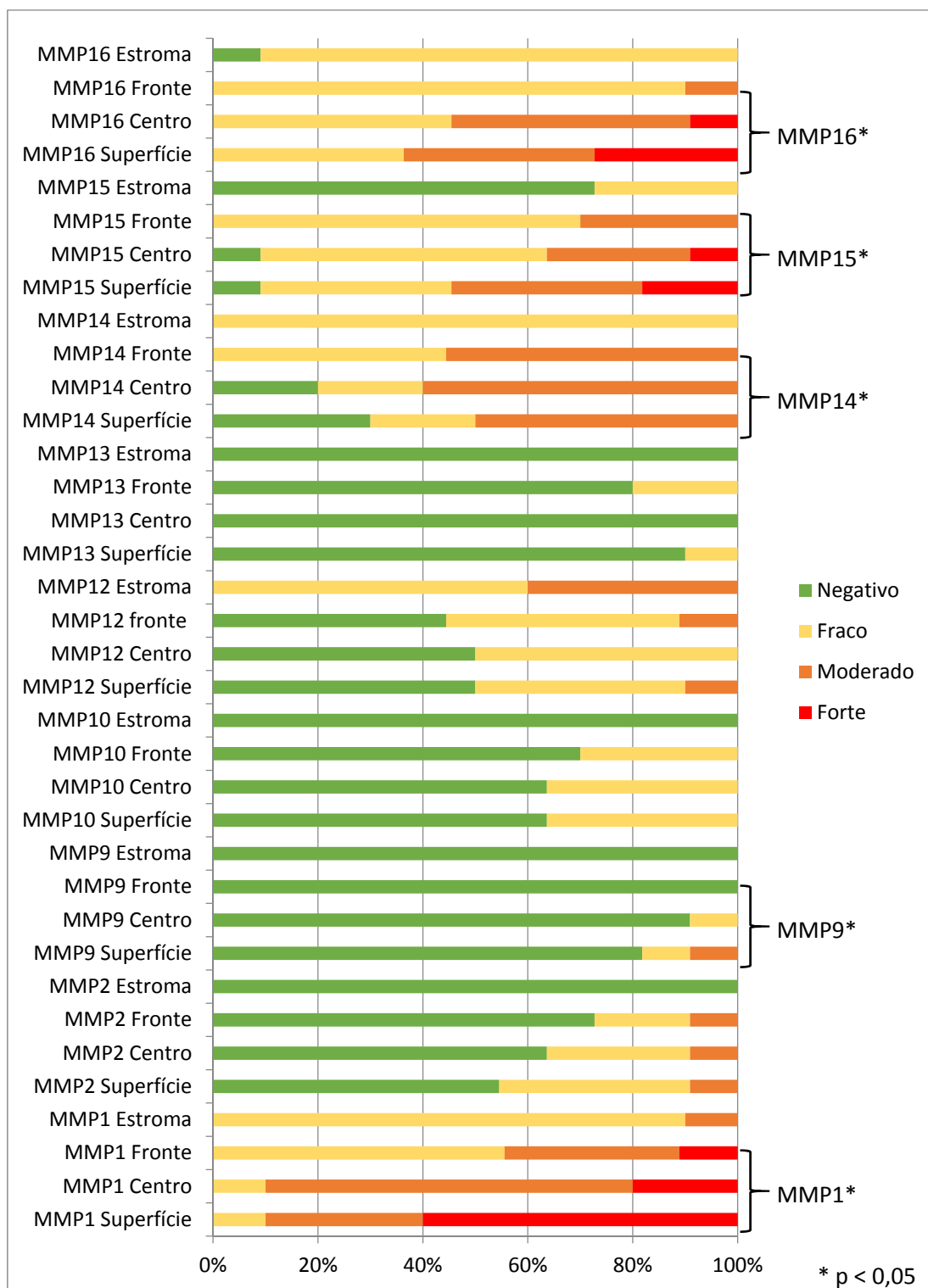


Figura 6 - Perfil de expressão de MMPs em 11 casos de carcinomas uroteliais invasivos em camada muscular própria (T2), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.

Quadro 3 - Avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados nos carcinomas uroteliais invasivos em camada muscular própria (T2).

MMPs	Compartimento	kappa	p
MMP-1	Superfície x Fronte	0,156	0,273
	Centro x Fronte	0,196	0,263
	Superfície x Centro	0,394	0,032
MMP-2	Superfície x Fronte	0,313	0,158
	Centro x Fronte	0,431	0,064
	Superfície x Centro	0,833	<0,01
MMP-9	Superfície x Fronte	0	1
	Centro x Fronte	0	1
	Superfície x Centro	0,267	0,216
MMP-10	Superfície x Fronte	1	0,02
	Centro x Fronte	1	0,02
	Superfície x Centro	1	0,01
MMP-12	Superfície x Fronte	0,813	0,002
	Centro x Fronte	0,6	0,033
	Superfície x Centro	0,818	0,003
MMP-13	Superfície x Fronte	0,154	0,598
	Centro x Fronte	0	1
	Superfície x Centro	0	1
MMP-14	Superfície x Fronte	0,038	0,828
	Centro x Fronte	0,234	0,231
	Superfície x Centro	0,5	0,027
MMP-15	Superfície x Fronte	0,206	0,28
	Centro x Fronte	0,464	0,04
	Superfície x Centro	0,598	0,001
MMP-16	Superfície x Fronte	0,016	0,899
	Centro x Fronte	0,216	0,219
	Superfície x Centro	0,577	0,006

4.2.5 Nos Pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Tecido Perivesical (T3)

A Figura 7 mostra o perfil de expressão das metaloproteinases nos 24 pacientes com carcinoma urotelial invasivo em tecido perivesical (T3). Devido a artefatos pré-analíticos, a avaliação de MMP-1 não foi realizada em um caso deste grupo. Observa-se que a MMP-1 mostrou positividade intensa ou moderada na grande maioria dos casos em todos os compartimentos da neoplasia. Esta expressão foi aumentada em relação à MMP-2, MMP-9, MMP-10 E MMP-13 neste grupo de pacientes ($p = 0,0002$). Nenhum caso demonstrou ausência de expressão deste marcador.

Por outro lado, para MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13, a expressão foi fraca ou ausente na maior parte dos casos. Todos estes marcadores foram hipoexpressos em relação à MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16, com diferença estatisticamente significativa em todas elas (respectivamente, $p = 0,0002$; $p < 0,0001$; $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$), sendo somente em uma pequena minoria, a expressão moderada (um caso para a MMP-2, dois casos para as MMP-9 e MMP-10 e nenhum para a MMP-13). Dentre estas MMPs, somente a MMP-13 mostrou um caso com expressão fortemente positiva na superfície, centro e frente de invasão.

O contrário é observado quando se analisa a expressão de MMP-14, MMP-15 e MMP-16. Estas três MMPs demonstraram positividade de marcação na maior parte dos casos, sendo consideradas hiperexpressas quando comparadas à MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13 (respectivamente, $p = 0,0005$, $p < 0,0001$ e $p = 0,0003$). Em relação à superfície tumoral, nove casos dos 24 foram fortemente ou moderadamente positivos para MMP-14, 13 casos para MMP-15 e 14 casos para MMP-16. Dentre estes marcadores, somente em quatro casos para MMP-14 e em dois casos para MMP-15 e MMP-16 a expressão foi completamente negativa.

A MMP-12 mostrou um perfil de expressão intermediário, pois foi mais expressa que a MMP-9 e MMP-13, e menos expressa que MMP-1 e MMP-15.

Em resumo, em pacientes com carcinomas uroteliais invasivos em tecido adiposo perivesical (T3), há uma expressão aumentada de MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16, e uma baixa expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13, todos estes achados com significância estatística.

Os resultados da avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados em tumores T3 podem ser vistos no Quadro 4.

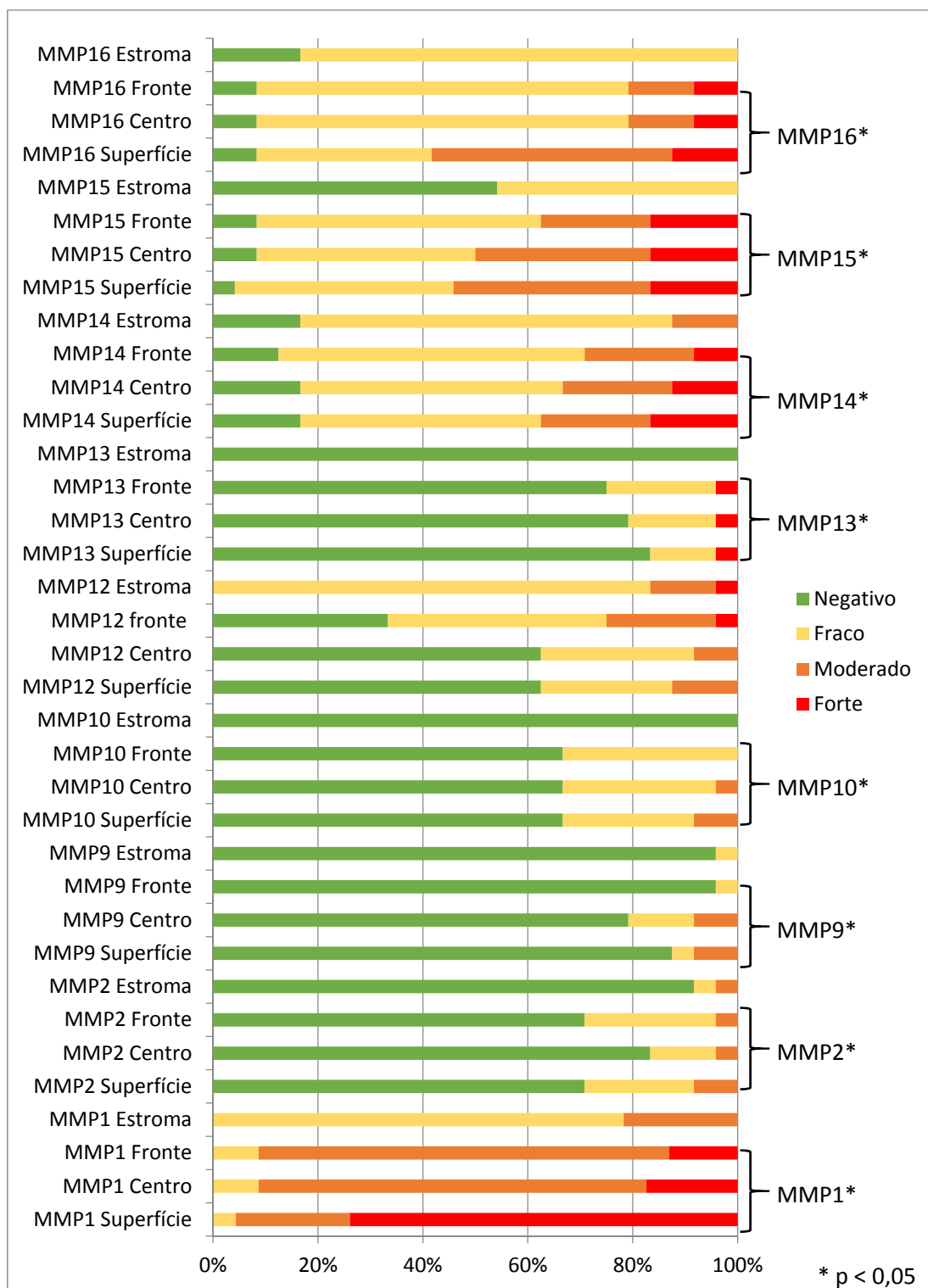


Figura 7 – Perfil de expressão de MMPs em 24 casos de carcinomas uroteliais invasivos em tecido perivesical (T3), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.

Quadro 4 - Avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados nos carcinomas uroteliais invasivos em tecido perivesical (T3).

MMPs	Compartimento	kappa	p
MMP-1	Superfície x Fronte	0,106	0,213
	Centro x Fronte	0,444	0,006
	Superfície x Centro	,139	0,15
MMP-2	Superfície x Fronte	0,341	0,042
	Centro x Fronte	0,668	<0,01
	Superfície x Centro	0,562	<0,01
MMP-9	Superfície x Fronte	0,217	0,071
	Centro x Fronte	0,118	0,322
	Superfície x Centro	0,718	<0,01
MMP-10	Superfície x Fronte	0,824	<0,01
	Centro x Fronte	0,909	<0,01
	Superfície x Centro	0,913	<0,01
MMP-12	Superfície x Fronte	0,244	0,059
	Centro x Fronte	0,298	0,024
	Superfície x Centro	0,921	<0,01
MMP-13	Superfície x Fronte	0,52	0,02
	Centro x Fronte	0,662	<0,01
	Superfície x Centro	0,869	<0,01
MMP-14	Superfície x Fronte	0,491	<0,01
	Centro x Fronte	0,803	<0,01
	Superfície x Centro	0,632	<0,01
MMP-15	Superfície x Fronte	0,373	0,004
	Centro x Fronte	0,565	<0,01
	Superfície x Centro	0,565	<0,01
MMP-16	Superfície x Fronte	0,275	0,009
	Centro x Fronte	0,822	<0,01
	Superfície x Centro	0,395	<0,01

4.2.6 Nos Pacientes com Carcinoma Urotelial Invasivo em Órgãos ou Estruturas Adjacentes (T4)

A Figura 8 mostra o perfil de expressão das metaloproteinases nos 17 pacientes com carcinoma urotelial invasivo em órgãos ou estruturas adjacentes (T4). Devido a artefatos pré-analíticos, a avaliação de MMP-1, MMP-2, MMP-12, MMP-

13 e MMP-14 não foi realizada em um caso deste grupo. Observa-se que a MMP-1 mostrou positividade intensa ou moderada na grande maioria dos casos, em todos os compartimentos da neoplasia, sendo considerada hiperexpressa quando comparada à MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP13 ($p = 0,0003$). Somente um caso demonstrou positividade fraca na superfície e centro da neoplasia, e quatro casos no fronte de invasão. Nenhum caso demonstrou ausência de expressão deste marcador.

A expressão de MMP-2, embora com uma tendência a ser baixa neste grupo de pacientes, não obteve significância estatística.

Semelhante ao que foi observado no grupo de pacientes com estadiamento T3, a expressão de MMP-9, MMP-10 e MMP-13 foi fraca ou ausente na maior parte dos casos estudados, foram consideradas hipoexpressas em relação à MMP-1, MMP-12, MMP-14, MMP-15 e MMP-16 (respectivamente, $p = 0,0027$; $p = 0,0047$ e $p = 0,0027$). Dentre estes casos, somente um caso de MMP-9 demonstrou positividade forte nestes tumores. Nas MMP-10 e MMP-13, nenhum caso foi fortemente positivo.

Seguindo a tendência do que já se observava nos pacientes T3, mas agora com significância estatística, a MMP-12 foi mais expressa nesses pacientes, quando comparada às MMPs 9, 10 e 13 ($p = 0,0009$), sendo positiva moderada ou fraca em mais da metade dos casos estudados.

Também semelhante ao que foi visto nos outros grupos de pacientes estudados com tumores invasivos a partir de T2, MMP-14, MMP-15 e MMP-16 demonstraram algum grau de positividade na grande maioria dos casos, seja ela forte, moderada ou fraca, conforme pode ser observado na Figura 8, sendo esta maior positividade com significância estatística (respectivamente $p = 0,0027$, $p = 0,0005$ e

$p = 0,0005$). MMP-15 e MMP-16 demonstraram ausência de expressão em somente um caso, cada.

Em resumo, o perfil de expressão de MMPs nos carcinomas uroteliais de bexiga invasivos em órgãos ou estruturas adjacentes (T4) demonstra uma expressão aumentada de MMP-1, MMP-12, MMP-14, MMP-15 e MMP-16, além de uma baixa expressão de MMP-9, MMP-10 e MMP-13, todos estes achados com significância estatística.

Os resultados da avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados em tumores T4 estão representados no Quadro 5.

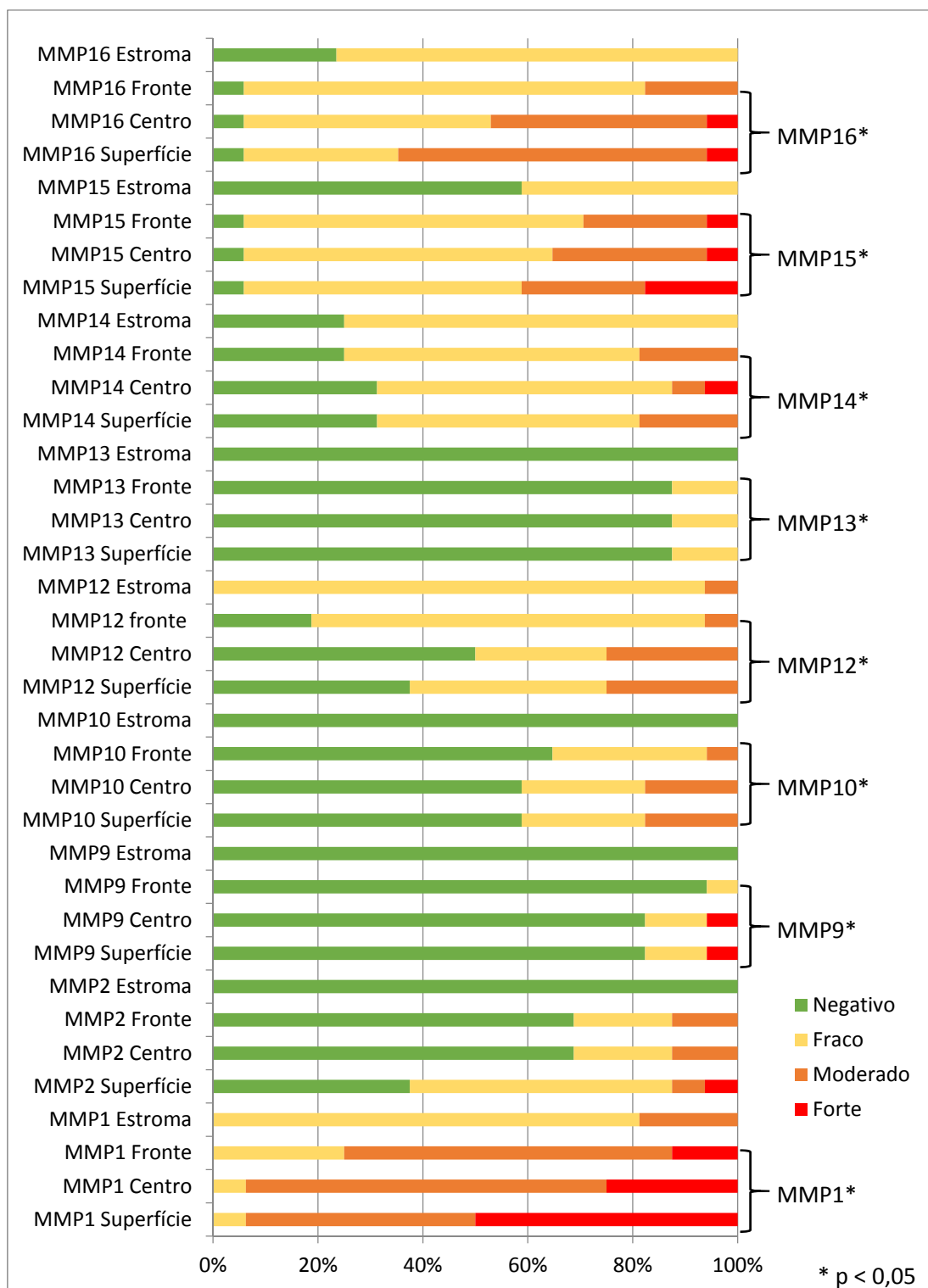


Figura 8 – Perfil de expressão de MMPs em 17 casos de carcinomas uroteliais invasivos em órgãos ou estruturas adjacentes (T4), de acordo com o compartimento tumoral avaliado.

Quadro 5 - Avaliação do grau de concordância da expressão dos marcadores entre os diferentes compartimentos tumorais avaliados nos carcinomas uroteliais invasivos em órgãos ou estruturas adjacentes (T4).

MMPs	Compartimento	kappa	p
MMP-1	Superfície x Fronte	0,133	0,359
	Centro x Fronte	0,403	0,016
	Superfície x Centro	0,562	0,003
MMP-2	Superfície x Fronte	0,415	0,006
	Centro x Fronte	1	<0,01
	Superfície x Centro	0,415	0,006
MMP-9	Superfície x Fronte	0,46	0,008
	Centro x Fronte	0,46	0,008
	Superfície x Centro	1	<0,01
MMP-10	Superfície x Fronte	0,782	<0,01
	Centro x Fronte	0,782	<0,01
	Superfície x Centro	1	<0,01
MMP-12	Superfície x Fronte	0,21	0,157
	Centro x Fronte	0,289	0,023
	Superfície x Centro	0,81	<0,01
MMP-13	Superfície x Fronte	0,429	0,086
	Centro x Fronte	0,429	0,086
	Superfície x Centro	1	0
MMP-14	Superfície x Fronte	0,484	0,008
	Centro x Fronte	0,474	0,006
	Superfície x Centro	0,795	<0,01
MMP-15	Superfície x Fronte	0,7	<0,01
	Centro x Fronte	0,892	<0,01
	Superfície x Centro	0,709	<0,01
MMP-16	Superfície x Fronte	0,119	0,353
	Centro x Fronte	0,27	0,092
	Superfície x Centro	0,712	<0,01

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO DAS MMPs DE ACORDO COM O ESTADIO PATOLÓGICO

Baseado nos resultados apresentados, chegou-se ao perfil de expressão imunohistoquímica das MMPs de acordo com o estadio patológico. Este perfil está resumido na Figura 9. Importante ressaltar que estes achados foram semelhantes tanto na avaliação de todos os compartimentos tumorais em conjunto, quanto quando foi considerado o fronte de invasão de forma isolada para análise. As Figuras 10 e 11 ilustram imagens representativas das reações imunohistoquímicas nos casos estudados.

	Ta	T1	T2	T3	T4
MMP-1					
MMP-2					
MMP-9					
MMP-10					
MMP-12					
MMP-13					
MMP-14					
MMP-15					
MMP-16					

Legenda:

- Alta expressão
- Baixa expressão
- Expressão não determinada (estatisticamente)
- Não realizada

Figura 9 - Perfil de expressão imunohistoquímica das metaloproteinases de matriz, de acordo com o estadio patológico.

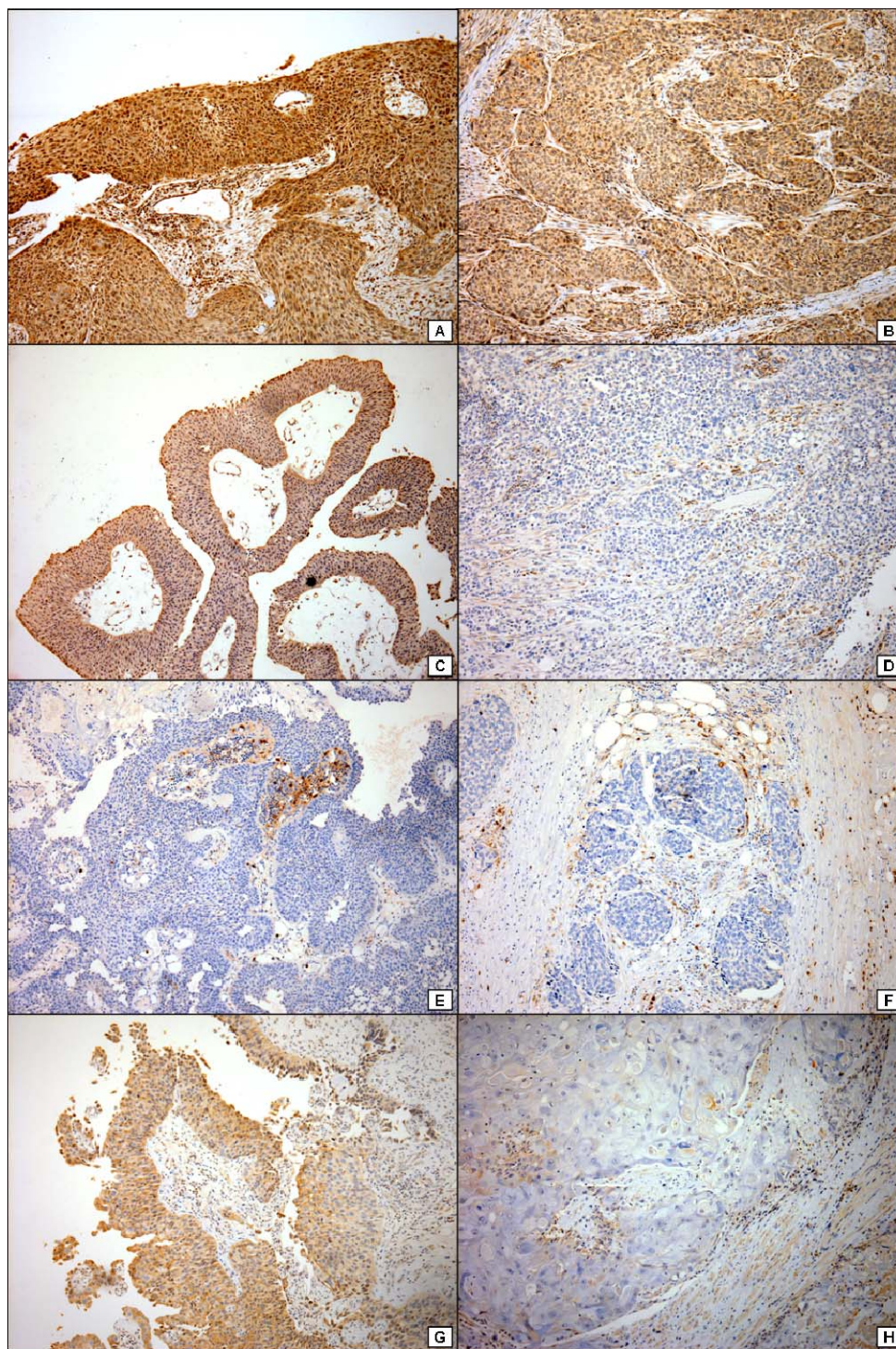


Figura 10 – Imagens representativas das reações imunoistoquímicas. MMP-1 fortemente expressa na superfície de um carcinoma urotelial invasivo (A) e moderadamente expressa nas células do centro da neoplasia, no mesmo caso (B). MMP-2 fortemente expressa em um caso de carcinoma urotelial papilífero não invasivo (C); ausência de expressão de MMP-2 nas células neoplásicas de um tumor músculo-invasivo, com controle interno positivo (células inflamatórias). Ausência de expressão de MMP-9 em um tumor papilífero não invasivo (E) e em um tumor músculo-invasivo (F), ambos com controle interno positivo. MMP-10 mostrando positividade moderada na superfície de um carcinoma urotelial papilífero não invasivo (G) e negatividade nas células neoplásicas de um tumor músculo-invasivo (H).

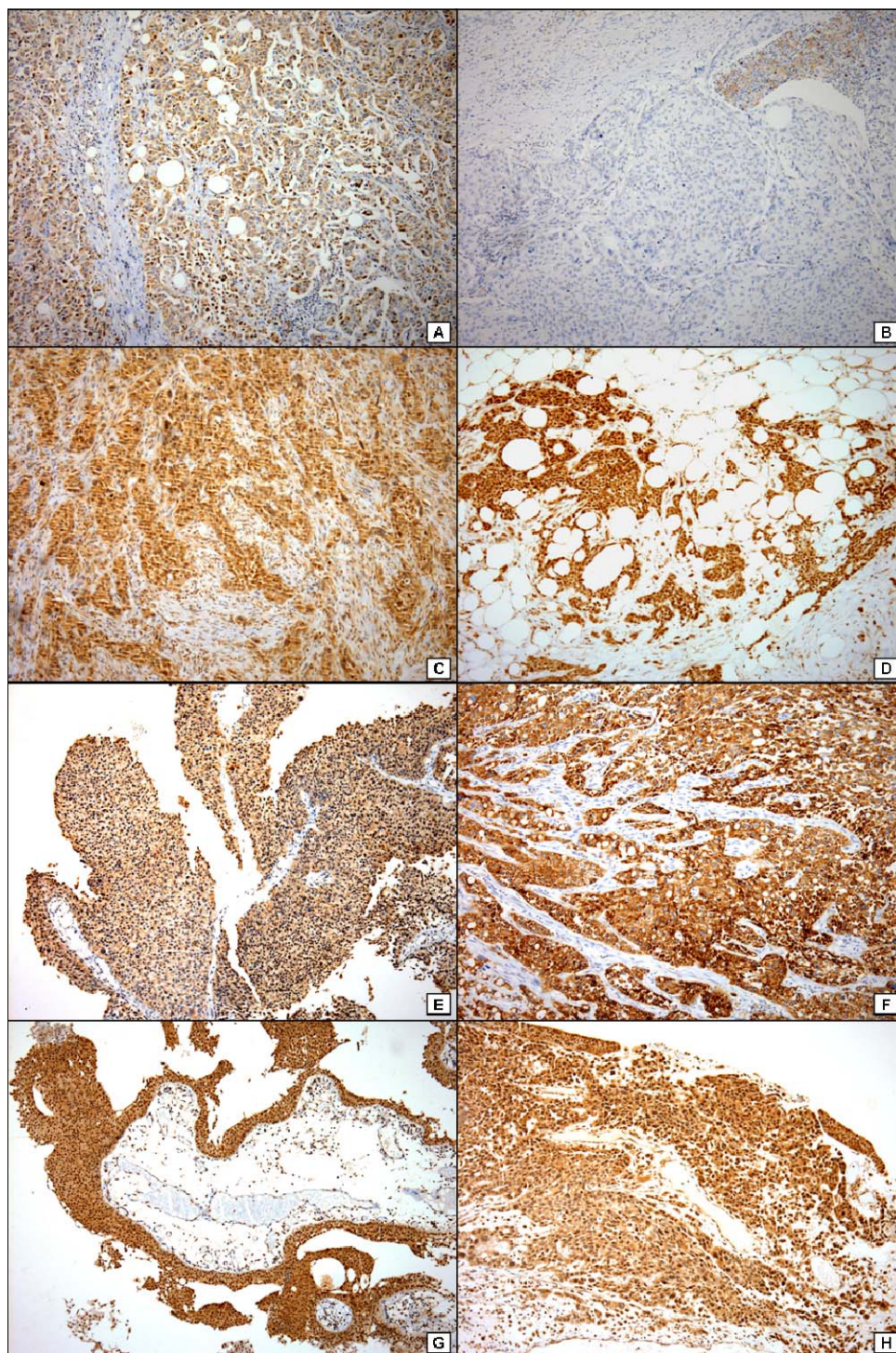


Figura 11 – Imagens representativas das reações imunoistoquímicas. MMP-12 moderadamente expressa no centro de um carcinoma urotelial invasivo em órgãos ou estruturas adjacentes (A). Ausência de expressão de MMP-13 em um carcinoma urotelial músculo-invasivo (B). MMP-14 fortemente expressa em um carcinoma urotelial músculo-invasivo (C) e em um carcinoma urotelial invasivo em tecido perivesical (D). MMP-15 moderadamente expressa em um carcinoma urotelial papilífero não invasivo (E) e fortemente expressa em um carcinoma urotelial invasivo em camada muscular própria (F). Expressão forte de MMP-16 em um carcinoma urotelial papilífero não invasivo (G) e em um tumor invasivo em tecido perivesical (H).

5 DISCUSSÃO

A avaliação da expressão imunoistoquímica de metaloproteinases de matriz foi realizada nos carcinomas uroteliais invasivos e não invasivos incluídos no estudo, divididos de acordo com seu estadiamento patológico. Especificamente, as MMP-1, MMP-12, MMP-13 e MMP-14 foram analisadas somente no grupo de pacientes submetidos à cistectomia total, uma vez que em grande parte dos casos de pacientes submetidos à ressecção transuretral de bexiga, o material representativo da lesão era escasso nos blocos de parafina. Baseado nos resultados das reações imunoistoquímicas, após as análises estatísticas, obteve-se o perfil de expressão das metaloproteinases, de acordo com o estadiamento patológico dos pacientes. Através do coeficiente de concordância Kappa, realizou-se a comparação entre os diferentes compartimentos tumorais analisados.

A MMP-1 é uma collagenase, com peso molecular de 57 kDa na sua forma de zimogênio e 47 kDa na sua forma ativa, atuando nos substratos colágenos I, II, III, VII e X, proteoglicanos, entactinas, ovostatinas, MMP-2 e MMP-9 (FABA et al. 2012). Já foi demonstrado que desempenha um importante papel na progressão tumoral. Tem sido extensivamente estudada em câncer de mama, tendo sido mostrada sua associação com progressão e prognóstico. LI et al. em 2015, demonstraram que a superexpressão de MMP-1 avaliada por estudo imunoistoquímico foi positivamente relacionada a estadio clínico mais avançado, presença de metástase linfonodal e a distância, em pacientes com câncer de mama. Além disso, pacientes com maior expressão de MMP-1 tiveram uma sobrevida

global significativamente menor quando comparados com aqueles com baixa expressão deste marcador. A análise multivariada mostrou ainda que o nível de expressão de MMP-1 foi um indicador prognóstico independente para a sobrevida dos pacientes, atuando como um bom marcador prognóstico.

Em carcinomas uroteliais, a MMP-1 foi estudada por OZDEMIR et al. em 1999 e NAKOPOULOU et al. em 2001. Ambos utilizaram o método de imunoistoquímica e observaram que esta metaloproteinase foi positiva em tumores invasivos, relacionando-se a parâmetros patológicos, como estadios e grau tumoral. No presente estudo obtivemos resultados semelhantes, uma vez que a análise da expressão da MMP-1 no grupo de pacientes com tumores invasivos T2, T3 e T4 demonstra que ela foi positiva em uma intensidade moderada ou forte. No entanto, não foi possível estudar este marcador nos tumores não músculo invasivos, para avaliar se essa expressão é diferente neste grupo de tumores.

As MMPs 2 e 9 são da classe das gelatinases e pesam, respectivamente, 72 kDa e 92 kDa em suas formas de zimogênio, e 66 kDa e 86 kDa em suas formas ativas. A primeira tem como substrato gelatina, colágenos IV, V, VII, VI, IX e X, elastina e fibronectina. A segunda possui estes mesmos substratos, além de colágeno XIV, entactina, osteonectina, plasminogênio e proteoglicanos. Ambas são as MMPs mais estudadas em câncer, de maneira geral, e em carcinoma urotelial. Porém, resultados conflitantes em relação a estes dois marcadores têm sido reportados. Deve-se ter em mente que isso talvez possa ser explicado pelo fato de que são estudos que não poderiam ou não deveriam ser comparados, por utilizarem grupos de pacientes com diferentes estadios patológicos e graus de doença, além de tipos de

amostras diferentes, como sangue, tecido e urina, tendo sido utilizados diferentes métodos de detecção.

Dentre os estudos em carcinomas uroteliais, mesmo se excluirmos aqueles que se utilizaram de outras técnicas de avaliação da expressão de MMP-2 (ELISA, zimografia e citometria de fluxo) e analisarmos somente os trabalhos que utilizaram a técnica de imunistoquímica, ainda sim os resultados encontrados na literatura são conflitantes. Enquanto que GRIGNON et al. em 1996 e OZDEMIR et al. em 1999, concluíram que a expressão de MMP-2 não se relacionava a estadiamento tumoral, VASALA et al. em 2003, mostrou que a alta expressão de MMP-2 estava sim relacionada ao estadiamento do tumor.

No presente estudo, observamos que MMP-2 parece ter um continuum de diminuição de expressão, na medida em que os tumores mais superficiais demonstraram uma alta expressão deste marcador, ao contrário dos tumores mais profundamente invasivos. Conforme observamos no Quadro 6, esta metaloproteinase mostrou-se estar altamente expressa em tumores Ta e T1. Em tumores T2, não foi possível determinar se ela estava muito ou pouco expressa. Já nos tumores T3 e T4, esta expressão tornou-se oposta à dos tumores não invasivos em camada muscular, estando a MMP-2 com baixa expressão. Corroborando ainda este achado, observamos que em todos os três casos de carcinoma urotelial *in situ*, a MMP-2 estava positivamente expressa. Estes resultados nos levam a pensar que a expressão de MMP-2 estaria muito mais associada aos tumores não invasivos, independente de sua via de carcinogênese, uma vez que, biologicamente, o carcinoma urotelial *in situ* tem maiores semelhanças genéticas com os tumores profundamente invasivos, do que com tumores uroteliais papilíferos não-invasivos. Desta maneira, sugere-se que a

MMP-2 esteja associada com o crescimento das neoplasias antes da invasão estromal.

Da mesma forma como ocorre com a MMP-2, os trabalhos na literatura mostram resultados divergentes em relação a MMP-9 e carcinomas uroteliais. Utilizando a técnica de imunoistoquímica, OZDEMIR et al. em 1999 e DONMEZ et al. em 2009, mostraram que a alta expressão de MMP-9 estava relacionada ao estadio do tumor. Por outro lado, GRIGNON et al. em 1996 e MOHAMMAD et al. em 2010 demonstraram que esta associação não existia. Um estudo realizado no Brasil por REIS et al. (2012), porém, utilizando a técnica de qRT-PCR, mostrou que uma expressão aumentada de MMP-9 está relacionada a pior prognóstico em carcinomas de bexiga.

Surpreendentemente, no nosso estudo, a expressão imunoistoquímica de MMP-9 em todos os estadios tumorais estudados foi considerada baixa ou ausente na maior parte dos casos, desde Ta, até os casos T4, incluindo-se os casos de Tis. É importante salientar que a reação imunoistoquímica funcionou adequadamente, demonstrada tanto através da positividade em lâminas de controle externo, como em controle interno nas próprias lâminas estudadas (positividade forte citoplasmática em células inflamatórias). Uma explicação para esta baixa expressão talvez seja possíveis diferenças de diluição utilizadas nos diferentes trabalhos, dados estes nem sempre disponíveis nas publicações. No nosso estudo, utilizamos uma diluição 1:400, que não é exatamente a recomendada pelo fabricante do anticorpo, que é de 1:50, mas foi a que melhor mostrou positividade em lâminas de controle externo sem expressar positividade inespecífica no fundo dos tecidos.

A MMP-10 é uma metaloproteinase da classe das lisinas estromais, possui um peso molecular de 53 kDa na sua forma de zimogênio e 47 kDa na sua forma ativa. Em neoplasias, de modo geral, existem inúmeros estudos que relacionam expressão aumentada de MMP-10 a pior comportamento clínico. Porém a maioria destes estudos demonstrou este resultados utilizando RT-PCR. Utilizando a técnica de imunoistoquímica, a expressão aumentada de MMP-10 mostrou-se estar associada com comportamento agressivo em pacientes com carcinoma de células de Merkel (FIGUERAS et al. 2007). Em carcinomas uroteliais, existe uma quantidade muito pequena de estudos que pesquisou a expressão deste marcador. Na literatura, encontramos somente o estudo de SEARGENT et al. que, em 2005, estudaram a MMP-10 pelo método de imunoistoquímica em carcinomas uroteliais e encontraram uma maior positividade em tumores mais superficiais (Ta e T1) quando comparados com tumores mais profundos (T2 ou pior). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo. Observando o Quadro 6 dos nossos resultados, é possível notar que nos tumores Ta e T1 houve uma expressão aumentada de MMP-10. Nos tumores T2 não foi possível determinação estatística se esta metaloproteinase estava com sua expressão aumentada ou diminuída. Entretanto, nos estadios T3 e T4 pôde-se comprovar uma diminuição significativa da expressão deste marcador, corroborando os resultados do estudo de SEARGENT et al. (2005).

Ao contrário da maioria das MMPs, que em geral mostram expressão aumentada em tumores mais invasivos, nós demonstramos uma relação inversa entre a expressão tanto de MMP-2 quanto de MMP-10 e potencial invasivo do músculo. Estes achados sugerem que a expressão de MMP-2 e MMP-10 é um evento precoce na tumorigênese de carcinomas uroteliais. Sugerem ainda que estas duas MMPs

estão envolvidas na expansão da massa de células neoplásicas em vez de invasão ou progressão da doença.

A MMP-12 é uma metaloproteinase que possui um peso molecular de 54 kDa em sua forma de zimogênio e 45 kDa em sua forma ativa. Tem como substratos o colágeno IV, gelatina, elastina, caseína, fibronectina, vitronectina, laminina, entactina, fibrina e fibrinogênio. Em neoplasias, já foi demonstrado que existe uma associação entre aumento da expressão imunoistoquímica de MMP-12 e pior prognóstico em câncer gástrico (ZHENG et al. 2013). Em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, foi demonstrado que alta expressão de MMP-12, utilizando-se o método de imunoistoquímica, estava relacionada a extravasamento capsular em metástases linfonodais (KIM et al. 2013). Um estudo com adenocarcinoma de pulmão mostrou que a expressão proteica de MMP-12 foi significativamente aumentada em comparação com tecidos não neoplásicos adjacentes e se relacionou a estadiopatológico e presença de metástases linfonodais nestes pacientes (LV et al. 2015). Não existem estudos na literatura que analisam a expressão imunoistoquímica deste marcador em carcinomas uroteliais. Nossos resultados demonstraram que em tumores T4, esta proteína está altamente expressa. Por outro lado, os resultados relativos aos tumores T2 foram indeterminados, não nos permitindo afirmar se houve expressão alta ou baixa deste marcador. No estadiopatológico T3 houve uma expressão aumentada desta metaloproteinase em relação às MMPs 9 e 13, porém menor que as MMPs 1 e 15. Como não realizamos a pesquisa deste marcador nos tumores Tis, Ta e T1, não podemos avaliar se essa expressão é alta ou baixa nestes grupo de tumores menos invasivos e não invasivos. Entretanto, pelos resultados obtidos, observa-se que tumores em estadiopatológico mais alto passam a expressar este marcador, sugerindo que

ele tenha um papel na invasividade de carcinomas uroteliais localmente avançados, assim como foi observado em outras neoplasias.

A MMP-13 é uma metaloproteinase da classe das collagenases, possui um peso molecular de 60 kDa na sua forma de zimogênio e 48 kDa na sua forma ativa. Tem como substratos os colágenos tipo I, II, III, VII, VIII, X, tenascina, plasminogênio, agrecan, fibronectina, osteonectina e MMP-9. Em neoplasias, de modo geral, ela tem sido extensivamente estudada e relacionada a maior agressividade na maior parte dos tumores. Entretanto, FODA et al. em 2013, estudou por imunoistoquímica a MMP-13 em carcinomas colorretais mucinosos e não mucinosos, e encontrou uma maior expressão desta metaloproteinase nos tumores não mucinosos. Interessantemente, neste estudo, os tumores mucinosos, ou seja, os que menos expressaram MMP-13, mostraram uma maior agressividade, avaliada através de uma maior profundidade de invasão e maior frequência de metástases linfonodais, quando comparados aos tumores não mucinosos. Em carcinomas uroteliais, a expressão imunoistoquímica de MMP-13 foi estudada por FABA et al. em 2007. Em 42 casos incluídos neste estudo, distribuídos nos estádios T2, T3 e T4, eles não encontraram nenhuma diferença estatística na expressão de MMP-13 relacionada a estágio tumoral, e concluíram que MMP-13 não é um marcador útil para avaliação de invasão tumoral. O presente estudo obteve resultados que corroboram este achado. Nós também só avaliamos MMP-13 em tumores músculo-invasivos, e embora em T2 não tenhamos obtido significância estatística em dizer que a expressão deste marcador foi menor, pudemos afirmar isto em tumores T3 e T4. O fato de este marcador não ter sido estudado em tumores menos invasivos deve ser levado em consideração, pois, não sabemos se esta metaloproteinase, como

observado na MMP-2 e MMP-10, se comportaria de maneira semelhante e mostraria uma diminuição de sua expressão à medida que o tumor se torna mais invasivo. É um achado interessante que merece ser melhor explorado em estudos posteriores.

A MMP-14, também conhecida como MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP), é uma metaloproteinase da classe das MMPs tipo membrana, possui um peso molecular de 66 kDa na sua forma de zimogênio e 54 kDa na sua forma ativa. Tem como substratos os colágenos tipo I, II, III, gelatina, fibronectina, osteonectina, laminina, vitronectina, entacina e a pró-MMP-2. Tem sido relacionada a aumento da invasividade tumoral e metástase, por meio da ativação da MMP-2. Em câncer de bexiga, sua expressão é aumentada em tecidos neoplásicos (MOHAMMAD et al. 2010). Além disso, MMP-14 é predominantemente expressa em células estromais, e essa alta expressão gênica se relaciona a alto grau tumoral, estadio tumoral avançado e pior prognóstico em pacientes com carcinoma de bexiga (KANAYAMA et al. 1998; WALLARD et al. 2006). Corroborando com estes estudos de expressão gênica, o presente estudo também demonstrou, por imunoistoquímica, uma expressão alta de MMP-14 nos casos avaliados, bem como nas células estromais ao redor da neoplasia (42 dos 50 casos estudados). Entretanto, novamente, os tumores mais superficiais não foram estudados e para determinar se essa expressão proteica aumentada é diferente neste grupo de tumores mais superficiais, é necessário que eles também sejam avaliados.

Juntamente com a MMP-14, as MMPs 15 e 16 são da classe das metaloproteinases tipo membrana. A MMP-15 pesa 76 kDa. A MMP-16 pesa 65 kDa em sua forma de zimogênio e 63 kDa em sua forma ativa. A primeira tem como substratos fibronectina, gelatina, vitronectina, entactina, laminina, e a pró-MMP-2.

Os substratos da segunda são colágeno III, gelatina, caseína, fibronectina e a pró-MMP-2. Em neoplasias, foi demonstrado, tanto em nível de mRNA como proteico, que a alta expressão de MMP-15 está associada a progressão tumoral e angiogênese em câncer de pulmão não-pequenas células (CHEN et al. 2014). O mesmo grupo de pesquisadores já havia demonstrado em 2010 que a expressão imunoistoquímica aumentada de MMP-15 em carcinomas de esôfago estava relacionada a angiogênese (CHEN et al. 2010). BODNAR et al. em 2013, encontrou associação entre maior expressão imunoistoquímica de MMP-15 e maior chance de metástases em carcinomas de células escamosas da laringe. ARAI et al. em 2007, constatou que a superexpressão de MMP-16 se correlacionou com invasão capsular em carcinomas hepatocelulares. Até o momento, não foram realizados estudos que avaliaram a expressão imunoistoquímica de MMP-15 e MMP-16 em carcinomas uroteliais. No presente estudo, a expressão imunoistoquímica destes marcadores se mostrou alta em todos os estadios patológicos estudados, de Ta a T4, incluindo os três casos de carcinoma urotelial *in situ*. Este é um achado novo na literatura, e deve ser melhor explorado posteriormente, inclusive com associação com dados clínicos e evolutivos dos pacientes.

Com relação à comparação do índice de concordância de expressão das MMPs nos diferentes compartimentos tumorais, observa-se, nos Quadros 3, 4 e 5, que o índice de concordância de expressão dos anticorpos na superfície tumoral, centro e frente de invasão é variável. No Quadro 3 observa-se que, nos tumores T2, se por um lado a avaliação de MMP-10 e MMP-12 nos diferentes compartimentos mostrou-se altamente concordante, ou seja, não faz diferença, nesses marcadores, que a avaliação do anticorpo seja realizada na superfície tumoral, centro ou frente de

invasão da neoplasia, por outro lado, a MMP-13 foi discordante em todos eles. Além disso, as demais MMPs estudadas neste grupo de pacientes mostrou um grau de discordância variável entre superfície e frente, superfície e centro, e frente e centro da neoplasia. Nos Quadros 4 e 5, observa-se que a concordância aumentou mais ainda entre os compartimentos tumorais avaliados nos diferentes marcadores estudados, sendo alta nas MMPs 2, 10, 14, 15 e 16, em tumores T3, e alta nas MMPs 2, 9, 10, 14 e 15, em tumores T4. As demais MMPs estudadas nestes dois grupos demonstraram algum grau de discordância entre a expressão dos marcadores nos diferentes compartimentos da neoplasia. Apesar desta variabilidade de concordância entre os compartimentos tumorais em algumas MMPs, não houve diferença na avaliação da expressão, quando considerado somente o frente de invasão. Ou seja, as mesmas MMPs que foram mais expressas quando foram considerados todos os compartimentos tumorais, mantiveram-se hiperexpressas quando avaliado apenas o frente de invasão. O mesmo ocorreu para as MMPs menos expressas. O conjunto destes achados mostra que embora existam pequenas diferenças na expressão das MMPs nos diferentes compartimentos tumorais, esta diferença não foi suficiente para alterar o perfil de expressão global, de cada uma das MMPs.

O estudo de metaloproteinases em neoplasias é um campo do conhecimento que tem sido explorado cada vez mais, devido aos potenciais alvos terapêuticos associados. Durante os últimos anos, a identificação de algumas MMPs específicas de tumores e necessárias para metástase resultou no desenvolvimento de inibidores de MMPs como agentes terapêuticos anti-câncer. Até recentemente, estudos clínicos com esses inibidores não tiveram muito sucesso. A falha destes fármacos foi atribuída ao seu amplo espectro de inibição de MMPs, atuando também em células

normais, além do seu uso em ensaios clínicos de câncer em estágio avançado, ignorando, por exemplo, que algumas MMPs parecem estar envolvidas no início da tumorigênese, como MMP-2 e MMP-10. Uma maior compreensão da expressão de MMPs, os seus perfis de atividade, e suas inter-relações é necessário para que elas possam se úteis como agentes terapêuticos anticancerígenos e auxiliem na batalha contra o câncer.

6 CONCLUSÕES

- 1 A avaliação da expressão imunoistoquímica das MMPs em carcinomas uroteliais mostrou que o perfil de expressão é o seguinte:
 - a. Tumores Ta e T1 têm uma alta expressão de MMP-2, MMP-10, MMP-15 e MMP-16; e uma baixa expressão de MMP-9.
 - b. Tumores T2 têm uma alta expressão de MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16; e uma baixa expressão de MMP-9.
 - c. Tumores T3 têm uma alta expressão de MMP-1, MMP-14, MMP-15 e MMP-16; e uma baixa expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13.
 - d. Tumores T4 têm uma alta expressão de MMP-1, MMP-12, MMP-14, MMP-15 e MMP-16; e uma baixa expressão de MMP-2, MMP-9, MMP-10 e MMP-13.
- 2 O índice de concordância entre expressão no fronte de invasão, superfície tumoral e centro da neoplasia foi variável entre as MMPs.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arai I, Nagano H, Kondo M, et al. Overexpression of MT3-MMP in hepatocellular carcinoma correlates with capsular invasion. **Hepatogastroenterology** 2007; 54:167-71.

Bateman JF, Boot-Handford RP, Lamande SR. Genetic diseases of connective tissues: cellular and extracellular effects of ECM mutations. **Nature Rev Genet** 2009; 10:173-83.

Bodnar M, Szyberg L, Kazmierczak W, Marszalek A. Differentiated expression of membrane type metalloproteinases (MMP-14, MMP-15) and pro-MMP2 in laryngeal squamous cell carcinoma: a novel mechanism. **J Oral Pathol Med** 2013; 42:267-74.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2014; 15:786-801.

Chan KS, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:14016-21.

Chen L, Di D, Luo G. Immunochemical staining of MT2-MMP correlates positively to angiogenesis of human esophageal cancer. **Anticancer Res** 2010; 30:4363-8.

Chen L, Zhou Q, Xu B, et al. MT2-MMP expression associates with tumor progression and angiogenesis in human lung cancer. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7: 3469–3477.

Davies B, Waxman J, Wasan H, et al. Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion. **Cancer Res** 1993; 53:5365-9.

Donmez G, Sullu Y, Baris S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and thrombospondin-1 (TSP-1) expression in urothelial carcinomas. **Pathol Res Pract** 2009; 205:854-7.

Faba OR, Gómez JMF, Redorta JP, Barmadah SE, Vizoso F, Mavrich HV. Significance of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) in invasive bladder cancer: correlation with pathological parameters. **Urol Int** 2007; 78:140-4.

Faba OR, Redorta JP, Gómez JMF, et al. Matrix metalloproteinases and bladder cancer: what is new? **ISRN Urol** 2012; 2012:581539.

Figueras MTF, Puig L, Musulén E, et al. Expression profiles associated with aggressive behavior in Merkel cell carcinoma. **Mod Pathol** 2007; 20:90-101.

Foda AA, El-Hawary AL, Aziz AA. Differential expression of matrix metalloproteinase-13 in mucinous and nonmucinous colorectal carcinomas. **Ann Diagn Pathol** 2013; 17:347-51.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. **J Cell Sci** 2010; 123:4195-200.

Grignon DJ, Sakr W, Toth M, 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; 56:1654-9.

Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci USA** 1962; 48:1014-22.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. **Science** 2009; 326:1216-9.

Hynes RO, Naba A. Overview of the matrisome - an inventory of extracellular matrix constituents and functions. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2012; 4:a004903.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. **Pharmacol Rev** 2009; 61:198-223.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61: 69-90.

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; 82:1359-66.

Kim JM, Kim HJ, Koo BS, Rha KS, Yoon YH. Expression of matrix metalloproteinase-12 is correlated with extracapsular spread of tumor from nodes with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2013; 270:1137-42.

Kubota Y, Miyamoto H, Noguchi S, et al. The loss of retinoblastoma gene in association with c-myc and transforming growth factor-beta 1 gene expression in human bladder cancer. **J Urol** 1995; 154:371-4.

Li Y, Cai G, Yuan S, et al. The overexpression membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with the progression and prognosis in breast cancer. **Am J Transl Res** 2015; 7:120-7. eCollection 2015.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2011; 3:a005058.

Lv FZ, Wang JL, Wu Y, Chen HF, Shen XY. Knockdown of MMP12 inhibits the growth and invasion of lung adenocarcinoma cells. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2015; 28:77-84.

McConkey DJ, Lee S, Choi W, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. **Urol Oncol** 2010; 28:429-40.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. **J Clin Oncol** 2006; 24:5552-64.

Mohammad MA, Ismael NR, Shaarawy SM, El-Merzabani MM. Prognostic value of membrane type 1 and 2 matrix metalloproteinase expression and gelatinase a activity in bladder cancer. **Int J Biol Markers** 2010; 25:69-74.

Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, et al. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2001; 9:130-7.

Netto GJ. Molecular genetics and genomics progress in urothelial bladder cancer. **Semin Diagn Pathol** 2013; 30:313-20.

Oxford G, Theodorescu D. The role of ras superfamily proteins in bladder cancer progression. **J Urol** 2003; 170:1987-93.

Ozdemir E, Kakehi Y, Okuno H, Yoshida O. Role of matrix metalloproteinase-9 in the basement membrane destruction of superficial urothelial carcinomas. **J Urol** 1999; 161:1359-63.

Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, et al. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. **BMC Urol** 2012; 12:18.

Seargent JM, Loadman PM, Martin SW, Naylor B, Bibby MC, Gill JH. Expression of matrix metalloproteinase-10 in human bladder transitional cell carcinoma. **Urology** 2005; 65:815-20.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. **TNM classificação de tumores malignos**. 7th ed. [Trad. de A L M Eisenberg]. 7^a ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012; Bexiga urinária; p.272-5.

Spiess PE, Czerniak B. Dual-track pathway of bladder carcinogenesis. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:844-52.

Szarvas T, vom Dorp F, Ergün S, Rübber H. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. **Nat Rev Urol** 2011; 8:241-54.

Vasala K, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. **Urology** 2003; 62:952-7.

Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, et al. Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. **Br J Cancer** 2006; 94:569-77.

Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:713-25.

Wu XR. Biology of urothelial tumorigenesis: insights from genetically engineered mice. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:281-90.

Zheng J, Chu D, Wang D, et al. Matrix metalloproteinase-12 is associated with overall survival in Chinese patients with gastric cancer. **J Surg Oncol** 2013; 107:746-51.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 14 de setembro de 2012.

A

Dra. Isabela Werneck da Cunha.

Aluna: Stephania Martins Bezerra (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1703/12

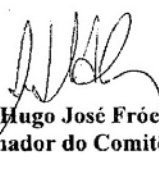
“Avaliação da expressão de metaloproteinases de matriz em carcinomas uroteliais de bexiga, invasivos ou não, com foco na determinação do fronte de invasão”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/09/2012, aprovaram a realização do projeto do estudo em referência (versão 1, datado de 27 de agosto de 2012) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1