

**MARCADORES MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO
E PROGNÓSTICO DE TUMORES NÃO-MÚSCULO
INVASIVOS DA BEXIGA: CONJUNTURA ATUAL E
PERSPETIVAS FUTURAS**

PEDRO NUNO PRATA GOMES

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor Belmiro Ataíde da Costa Parada

Índice

Lista de Abreviaturas.....	3
Resumo.....	4
Abstract	5
Introdução.....	6
Materiais e Métodos	8
Resultados	9
I. Marcadores moleculares para efeitos de diagnóstico de TNMIB.....	9
II. Marcadores moleculares de recorrência de TNMIB.....	13
III. Marcadores moleculares de progressão para carcinomas músculo invasivos	17
Discussão.....	23
Conclusão.....	25
Referências Bibliográficas	26

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico;

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin;

CGH - *Comparative Genomic Hybridization*;

cIAP1 - Proteína inibidora da apoptose celular 1;

cIAP2 - Proteína inibidora da apoptose celular 2;

Cis - Carcinoma *in situ*;

COX2 - Ciclooxigenase 2;

EN2 - Engrailed-2;

EORTC – Organização Europeia para Investigação e Tratamento do Cancro;

FISH - Hibridização fluorescente *in situ*;

HIP/PAP - Proteína associada ao hepatocarcinoma-intestino-pâncreas/pancreatite;

IAP - Proteínas inibidoras da apoptose;

miRNA – MicroRNAs;

Nampt - Enzima Nicotinamida fosforilbosltransferase;

RBX1 - Proteína Ring box 1;

RTU - Ressecção transuretral;

SPAG9 - Antígeno associado ao esperma 9;

TMIB - Tumores músculo invasivos da bexiga;

TNMIB - Tumores não-músculo invasivos da bexiga;

VPN - Valor preditivo negativo;

VPP - Valor preditivo positivo.

Resumo

O cancro da bexiga é uma doença heterogénea, que se apresenta em cerca de 75% das vezes sob a forma de tumores não-músculo invasivos. Estes tumores apresentam altas taxas de recorrência e cerca de 10 a 15% progridem para formas músculo invasivas. Atualmente, as estratégias de diagnóstico e seguimento baseiam-se na realização de cistoscopias e citologias urinárias. Nos últimos anos vários marcadores moleculares têm sido investigados, de forma a esclarecer o seu envolvimento no processo neoplásico vesical, bem como a sua possível utilização como marcadores de diagnóstico, recorrência ou progressão no cancro da bexiga. O presente trabalho teve como objetivo principal sumariar os marcadores moleculares mais recentemente investigados e propostos para validação.

Foi realizada uma pesquisa com base na PubMed, centrada em trabalhos publicados de Agosto de 2010 a Agosto de 2015, escritos em Português e Inglês e utilizando as palavras-chave “bexiga”, “não-músculo invasivo” e “marcadores”.

Vários marcadores moleculares foram descritos como potenciais candidatos a utilização na prática clínica (P53, *Survivin*, Ki-67,...), alguns apresentando características como facilidade de análise, baixo custo ou capacidade para melhorar a estratificação de risco usada atualmente. No entanto os estudos apresentam maioritariamente baixa força estatística, não são reprodutíveis e alguns apresentam resultados distintos para o mesmo marcador molecular.

Perante a evidência atual, continua a não ser aceite a utilização de marcadores moleculares na prática clínica. Estudos com maior força estatística terão que ser realizados para que ocorra a validação destes marcadores moleculares. No futuro poderão ser introduzidos marcadores moleculares na prática clínica, para utilização em conjunto com as tabelas de estratificação de risco disponíveis atualmente.

Abstract

Bladder cancer is a heterogeneous disease that presents in about 75% of the time in the form of non-muscle invasive tumors. These tumors have high rates of recurrence and approximately 10 to 15% progress to muscle invasive forms. Currently, the strategies for diagnosis and monitoring are based on performing cystoscopy and urine cytology. In recent years many molecular markers have been investigated in order to clarify its involvement in the bladder neoplastic process, as well as its possible use as diagnostic, progression or recurrence markers of bladder cancer. This study aimed to summarize the most recently investigated and proposed for validation molecular markers.

A research based on PubMed was conducted, focusing on works published from August 2010 to August 2015, written in Portuguese and English and using the keywords "bladder", "non-muscle invasive" and "markers".

Several molecular markers have been described as potential candidates for use in clinical practice (P53, Survivin, Ki-67, ...), some of them presenting characteristics such as ease of analysis, low cost and ability to enhance the risk stratification currently used. However, most studies have low statistical power, are not reproducible and some have distinct results for the same molecular marker.

Given the current evidence is still not accepted the use of molecular markers in clinical practice. Studies with higher statistical power will have to be made to occur the validation of molecular markers. In the future molecular markers may be introduced in clinical practice for use in conjunction with the risk stratification tables currently available.

Introdução

O cancro da bexiga apresenta-se atualmente como o 5º mais comum no mundo Ocidental[1], sendo o 11º mais diagnosticado a nível mundial[2]. A sua incidência e mortalidade variam globalmente devido a diferenças nos fatores de risco, práticas de diagnóstico e tratamentos disponíveis[2]. Na União Europeia, a incidência padronizada para a idade (por 100,000 pessoas-ano) é de 27 no homem e 6 na mulher, enquanto a taxa de mortalidade padronizada para a idade (por 100,000 pessoas-ano) é de 8 no homem contra 3 na mulher[2]. Estas taxas situam-se bem acima dos números globais, com taxa de incidência mundial de 8,9 no homem e 2,2 na mulher, bem como taxa de mortalidade de 3,3 contra 0,9 no homem e mulher, respetivamente[2].

Clinicamente esta neoplasia caracteriza-se pela presença de hematúria, sendo este o sintoma de apresentação predominante. A dor vesical e os sintomas de armazenamento do trato urinário podem ocorrer, especialmente no Cis. O exame objetivo por norma não fornece dados de relevo para o diagnóstico, em fases iniciais, tendo para isso de se recorrer a exames imagiológicos (tomografia computadorizada e ecografia), citologia urinária e cistoscopia com análise histopatológica das biópsias recolhidas[2].

De todos os doentes com cancro da bexiga, cerca de 75% apresentam lesões superficiais confinadas à mucosa e submucosa (graus Ta/Cis e T1, respetivamente), com elevada taxa de sobrevivência devido à sua baixa mortalidade específica[2]. Os tumores não-músculo invasivos da bexiga (TNMIB) apresentam a mais alta taxa de recorrência de todos os carcinomas[3], até 60% após 5 anos da primeira resseção transuretral (RTU)[1], sendo também o carcinoma mais caro por paciente desde o momento do diagnóstico até à morte[3]. Por outro lado, cerca de 10-20% dos TNMIB progridem para tumor músculo invasivo da bexiga (TMIB)[4], caracterizado por ter taxas de mortalidade muito superiores e cuja abordagem necessita de maior agressividade. De facto, apesar da cistectomia radical,

radioterapia e quimioterapia a que estes doentes são submetidos, o resultado em termos de prognóstico é desencorajador, o que reforça a necessidade de um diagnóstico precoce[4]. Assim, torna-se evidente a necessidade de implementar as melhores técnicas de diagnóstico e seguimento.

O protocolo estabelecido para o diagnóstico e seguimento dos doentes com TNMIB baseia-se na cistoscopia (sensibilidade de 80%) e na citologia urinária (sensibilidade de 30%)[2,3]. Durante o seguimento, são realizadas cistoscopias e citologias urinárias 3 meses após a ressecção da lesão, bem como: de 3 a 12 meses, no período mínimo de 5 anos, nos casos de tumores com classificação de baixo risco; ou até à morte, nos tumores com classificação de médio/alto risco[2]. Contudo, a cistoscopia é um procedimento caro, invasivo, desconfortável e com riscos iatrogénicos[3,4]. Das cistoscopias realizadas durante o seguimento, inúmeras são negativas, podendo a sua realização ser evitada[3]. Atualmente, nenhum marcador molecular é usado clinicamente para prever a progressão ou recorrência de TNMIB[1], nem pode ser utilizado para diminuir a frequência de cistoscopias no seguimento dos doentes[2].

Por estas razões, trata-se de uma área em constante investigação, com múltiplos estudos e artigos publicados anualmente. É importante sumariar toda a informação que vai sendo publicada, tendo este trabalho como objetivo principal esclarecer quais os marcadores moleculares que mais recentemente têm vindo a ser investigados e propostos para validação, de forma a tornarem-se um apoio ou mesmo uma alternativa viável aos métodos de diagnóstico e seguimento considerados atualmente.

Materiais e Métodos

De forma a realizar este artigo de revisão foi consultada a base eletrónica PubMed, limitando a pesquisa a artigos de Agosto de 2010 até Agosto de 2015, sendo incluídos artigos de revisão, artigos originais, ensaios clínicos, entre outros. A pesquisa foi ainda orientada para artigos em Português e Inglês, sendo restringida utilizando as seguintes palavras-chave: “bexiga”, “não-músculo invasivo”, “marcadores”. O trabalho de pesquisa foi realizado pelo Serviço de Documentação do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Foram ainda pesquisadas manualmente *guidelines* internacionais e estudos com potencial interesse para a realização do artigo de revisão.

A seleção dos artigos iniciou-se pela análise dos títulos e *abstracts* obtidos na pesquisa original, de forma a identificar estudos com interesse potencial para o trabalho. Posteriormente, foi feita a análise de todo o conteúdo dos artigos selecionados na primeira fase como relevantes. Caso a totalidade do artigo não estivesse disponível, este era excluído do trabalho.

Resultados

A literatura publicada nos últimos anos, particularmente nos quais esteve centrada a presente investigação, surgiu a elevado ritmo, demonstrando a importância que este assunto apresenta e a urgência de encontrar métodos alternativos eficazes para o diagnóstico e seguimento dos doentes com carcinoma da bexiga. A investigação efetuada e sobre a qual este trabalho se baseia, dedicou-se a três grandes grupos de marcadores moleculares:

- I. Os marcadores moleculares urinários e plasmáticos para diagnóstico de carcinoma da bexiga, mais concretamente TNMIB;
- II. Os marcadores moleculares urinários, tecidulares (em peças de biópsia/RTU) e plasmáticos de recorrência de TNMIB, após resseção transuretral (RTU);
- III. Os marcadores moleculares urinários, tecidulares (em peças de biópsia/RTU) e plasmáticos de progressão de TNMIB para tumores músculo invasivos.

I. Marcadores moleculares para efeitos de diagnóstico de TNMIB

De maneira a desenvolver testes acessíveis e minimamente invasivos para o diagnóstico de carcinomas da bexiga, bem como diminuir o número de cistoscopias realizadas no seguimento de doentes com TNMIB[3], têm sido efetuados e publicados diversos estudos.

Devido ao conhecimento mais aprofundado das vias moleculares envolvidas na carcinogénese, foram desenvolvidas técnicas de análise molecular que podem ser utilizadas em células presentes na urina e mais concretamente no seu ADN[3]. Assim, através da análises de mutações pontuais, zonas de metilação, perda de heterozigotia e estrutura cromossómica, foi possível identificar várias alterações presentes de forma mais comum no carcinoma da bexiga e que podem ser potenciais alvos de diagnóstico[3]. As alterações mais

comuns surgem nos braços cromossômicos 9p, 9q, 8p, 3q, 7p e 17q[5,3]. Em 2013, O. Cussenot et al.[3] desenvolveu o primeiro teste para potencial uso clínico, utilizando a tecnologia de *Comparative Genomic Hybridization* (CGH) em amostras de urina, esta tecnologia permite analisar as alterações cromossômicas mais comuns (9p, 9q e 8p) (Figura1). Este teste demonstrou uma sensibilidade de 95% e especificidade de 51%, valor preditivo positivo (VPP) de 45% e valor preditivo negativo (VPN) de 96%, considerando uma amostra de 134 doentes analisados. Além disso, demonstrou que as alterações cromossômicas são maiores em tumores de alto grau e que 100% desses tumores foram diagnosticados. Desta forma são necessários ensaios com maior força estatística e com comparação a outros marcadores moleculares disponíveis, para que o teste desenvolvido possa ser aprovado e utilizado num futuro próximo[3].

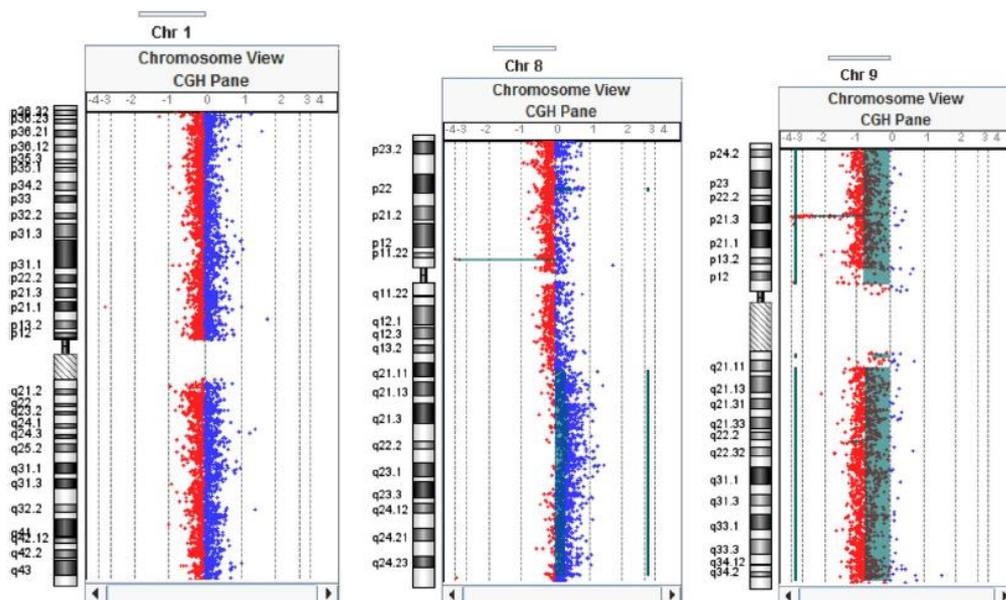


Figura 1 Exemplo de perfil normal no cromossoma 1, um ganho no cromossoma 8q e uma deleção no cromossoma 9p, utilizando a tecnologia CGH [3].

Outro método de estudo aplicado aos tumores da bexiga teve por base a metabolómica, uma área científica que se dedica ao estudo dos metabolitos presentes nos fluidos biológicos. O cancro da bexiga surge como ideal para este tipo de estudo devido ao

contacto direto da urina com as lesões tumorais, bem como a colheita cómoda e não invasiva da amostra que se pretende analisar[4]. Guiado por este princípio, X. Jin et al.[4] realizou em 2013 o estudo com o maior número de participantes até à data (138 doentes com diagnóstico estabelecido e 121 controlos). No estudo foram ainda incluídos doentes com hematúria, de forma a testar a interferência desta variável de confundimento. Os resultados traduziram uma diferença clara no perfil de metabolitos entre o grupo controlo e o grupo de doentes com cancro da bexiga (tendo o grupo de doentes níveis bastante elevados de acetil-coenzima A e carnitina, entre outros), bem como entre os doentes com TNMIB e com carcinoma músculo invasivo. Ao avaliar a capacidade do teste diagnosticar os doentes com carcinoma obteve-se uma sensibilidade de 91,3% e uma especificidade de 92,6%. A estes valores positivos associa-se a facilidade do teste e o valor da amostra, a maior utilizada até à data, tornando-o num possível teste com interesse clínico a curto prazo[4].

Ainda na análise de marcadores urinários, Y. Nitta et al.[6] investigou a possibilidade da proteína associada ao hepatocarcinoma-intestino-pâncreas/pancreatite (HIP/PAP) servir de marcador molecular para o diagnóstico de cancro da bexiga. Esta proteína secretora tem um papel ativo na regeneração tecidual e inflamação dos órgãos digestivos, mas também é expressa em vários tipos de carcinomas.[6] Neste estudo ficou provado o aumento da concentração desta proteína nas amostras urinárias colhidas de doentes com cancro, face à sua concentração no grupo controlo. Ficou ainda demonstrada a sua expressão, através de *western blot*, em várias linhas celulares de cancro da bexiga (Figura 2). A sensibilidade do teste urinário realizado, através de um teste ELISA, foi de 80,2% e a especificidade de 78,2%[6].

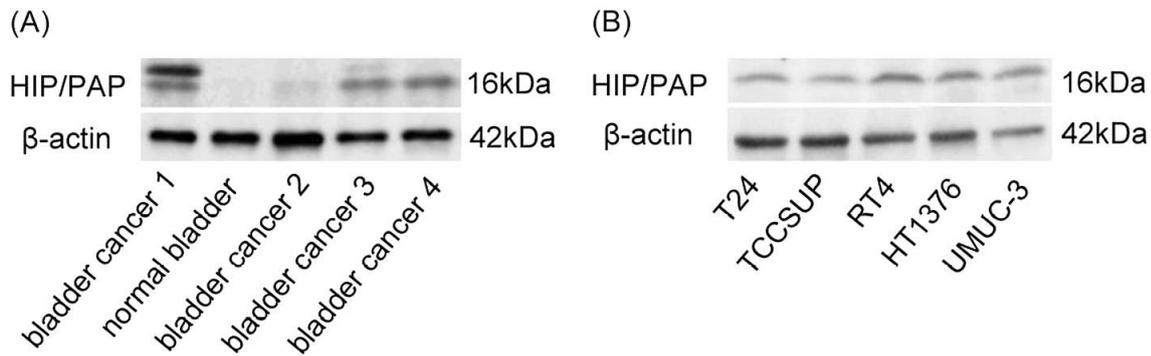


Figura 2 Expressão da proteína HIP/PAP através de *western blot*. (A) Expressão da proteína HIP/PAP em tecido de bexiga normal e em tecidos com carcinoma da bexiga. (B) Expressão da proteína HIP/PAP em linhas celulares de cancro da bexiga.[6]

O fator de transcrição *Engrailed-2* (EN2) foi recentemente associado ao cancro da mama e da próstata, sendo um fator de expressão e libertação específica tumoral[7]. R. Morgan et al. demonstrou que este fator também se encontra aumentado no carcinoma da bexiga, tendo obtido uma sensibilidade e especificidade global para o diagnóstico através da medição da concentração urinária de EN2 de 82 e 75%, respetivamente. Assim, o fator de transcrição EN2 apresenta-se como candidato a marcador molecular para diagnóstico de carcinoma da bexiga, sendo que estudos de maior validade ainda serão necessários e a sua utilização a curto prazo não é expetável[7].

Recentemente foi descoberta uma nova categoria de antígenios tumorais, os *Cancer-testis*, que são considerados alvos de deteção tumoral e com potencial imunoterapêutico[8]. Dentro desta categoria foi identificado o antígeno associado ao esperma 9 (SPAG9) e provada a sua colaboração na ativação da mitose celular[8]. Assim, D. Kanojia et al.[8] investigou com sucesso a expressão de SPAG9 em peças histológicas de doentes com carcinoma da bexiga e em linhas celulares de cancro da bexiga. Mais ainda, demonstrou que a expressão está aumentada nas fases iniciais do desenvolvimento tumoral, provando a sua relação com o processo carcinogénico[8]. Apesar desta descoberta, a utilização do SPAG9

como marcador para utilização clínica não parece provável, tendo apenas interesse investigacional.

A nível de marcadores séricos, foi investigada a possibilidade da enzima Nicotinamida fosforilbossiltransferase (Nampt), já implicada na literatura como aumentada em casos de cancro do pulmão, de cancro colo-retal, de cancro da mama e de cancro da próstata[9], se apresentar também com concentração sérica aumentada no carcinoma da bexiga. K. Zhang et al.[9] demonstrou que o nível sérico de Nampt aumentou de um valor médio de 6,46 ng/ml no grupo de controlo, para o valor de 16,02 ng/ml no grupo de doentes (Figura 3) [9]. Assim sugere-se o uso potencial desta enzima como marcador molecular de carcinoma da bexiga, sendo que o seu papel neste processo necessita ainda de maior investigação[9].

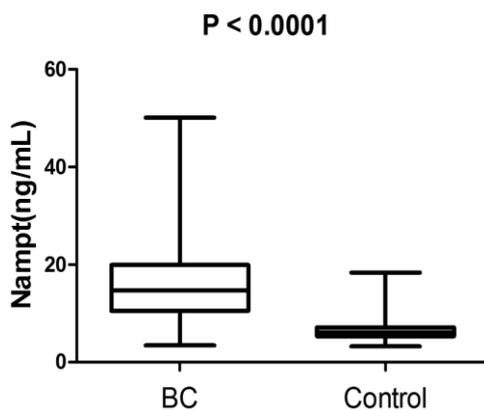


Figura 3 Concentração sérica de Nampt em indivíduos com carcinoma da bexiga versus grupo de controlo.[9]

II. Marcadores moleculares de recorrência de TNMIB

Os TNMIB apresentam altas taxas de recorrência após a RTU do tumor (60% aos 5 anos) tornando-se num dos carcinomas mais dispendiosos por paciente. Por essa razão tem de ser mantido um seguimento apertado com realização periódica de cistoscopias e citologias urinárias. Os seguintes trabalhos tiveram como objetivo apresentar futuras alternativas a este seguimento.

O antígeno Ki-67 apresenta-se descrito na literatura como um marcador de proliferação celular associado a várias fases do ciclo celular, estando já descrita a sua relação com a recorrência de TNMIB.[10] D. Weihong et al.[10] tentou demonstrar o valor preditivo da expressão deste antígeno e melhorar a estratificação dos doentes com TNMIB, associando as tabelas de risco da EORTC com o *status* de Ki-67. Dos 332 doentes em estudo, 108 expressaram Ki-67, havendo uma relação entre esta expressão e a presença de lesões multifocais, Cis e tumor de grau mais elevado. O autor provou no seu estudo que o Ki-67 é um indicador significativo de recorrência de lesões (Figura 4), bem como demonstrou que a associação do Ki-67 com as tabelas de risco da EORTC melhora a estratificação de doente e o estabelecimento de prognóstico. Adicionalmente, L. Wang et al.[11] observou outra correlação envolvendo o Ki-67: quando a sua expressão está aumentada juntamente com a expressão do gene P53 (gene supressor tumoral envolvido em múltiplos processos cancerígenos), ocorre um aumento significativo na recorrência de TNMIB[11]. A expressão deste antígeno tem condições para se tornar um marcador com interesse clínico a curto prazo, mais precisamente para utilização em conjunto com as tabelas de risco da EORTC.

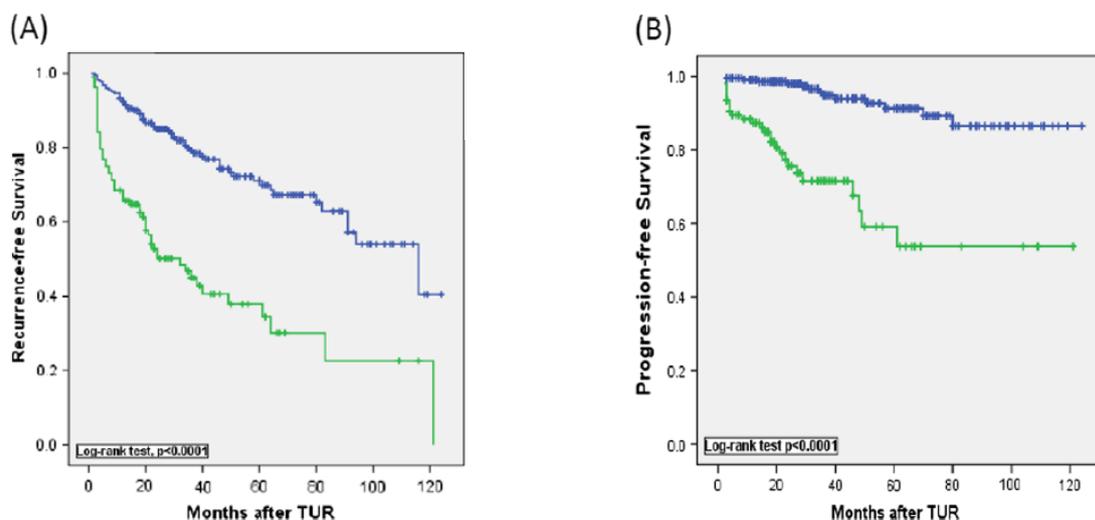


Figura 4 Estimativa de sobrevivência livre de recorrência (A) e de progressão (B) através de análise Kaplan-Meier, em 332 doentes. Pacientes com expressão de ki-67 negativa (cor azul), apresentam melhor prognóstico do que os doentes com expressão positiva (cor verde).[10]

Um importante mecanismo envolvido na carcinogénese é o silenciamento de genes supressores tumorais, nomeadamente através de metilação aberrante dos seus promotores[12]. O CDH13 é um desses genes supressores tumorais que recentemente foi associado ao cancro da bexiga. Posto isto, Y. Lin et al.[12] estudou a presença de metilação deste gene em peças de biópsia de TNMIB e colocou a hipótese desta se relacionar com a recorrência de lesões. Após a análise de 178 doentes e 38 controlos foi possível observar a metilação em 44,9% dos doentes e 0% do grupo controlo. Mais ainda, os doentes com esta característica apresentaram menor sobrevivência livre de recorrência e maior progressão para carcinoma músculo invasivo[12]. Estudos adicionais são necessários para esclarecer se o CDH13 é um possível marcador molecular para utilização clínica, ou o seu interesse será apenas investigacional.

Outro grupo de genes bem estudado consiste nos inibidores da apoptose, nos quais se incluem as proteínas *Livin* e *Survivin*. Estas proteínas são expressas em variados processos neoplásicos como o cancro do pulmão, cancro da bexiga, ou melanoma, aumentando a sua resistência a radio e quimioterapia e prejudicando o prognóstico[13]. A sua atividade anti-apoptose relaciona-se com a interação com a *Caspase 3* (proteína integrante da cascata apoptótica) e por esse motivo J. Wang et al.[13] averiguou a expressão destas três proteínas em peças de RTU de TNMIB, a sua correlação e possível valor prognóstico. O autor demonstrou neste trabalho que a recorrência é mais frequente em doentes com elevada expressão de *Livin* e *Survivin* e baixa expressão de *Caspase 3*, enquanto os doentes com baixa expressão de *Livin* e *Survivin* e elevada expressão de *Caspase 3* apresentam maior tempo de sobrevivência sem recorrência[13]. Concluiu-se que a *Livin*, *Survivin* e *Caspase 3* apresentam um efeito combinado no comportamento dos TNMIB, sendo que o seu *status* pode fornecer informações de elevado interesse clínico e prever a recorrência de lesões[13], tornando-as marcadores de possível interesse clínico a curto prazo.

Embora não seja expressa na maioria dos tecidos em ambiente de normalidade, a cicloxigenase 2 (COX2) apresenta-se aumentada em diversas condições malignas devido à sua ativação por fatores de crescimento e inflamação[14]. T. Tadin et al.[14] estudou a possibilidade da expressão aumentada de COX2 se relacionar com o aumento da recorrência de TNMIB (Figura 5). Adicionalmente também estudou a implicação da presença ou ausência de linfócitos infiltrados tumorais na sobrevivência livre de recorrência destes doentes. Dos doentes em estudo, 71% revelou expressão de COX2 e 59% a presença de linfócitos. Contrariamente ao que era previsto demonstrou-se que os doentes que não expressam COX2 apresentam maior taxa de recorrência. Também os doentes que não apresentam linfócitos infiltrados apresentam maior taxa de recorrência. Assim concluiu-se que os doentes com menor expressão de COX2 e ausência de linfócitos infiltrados tumorais necessitam de seguimento mais apertado pela sua elevada taxa de recorrência esperada[14].

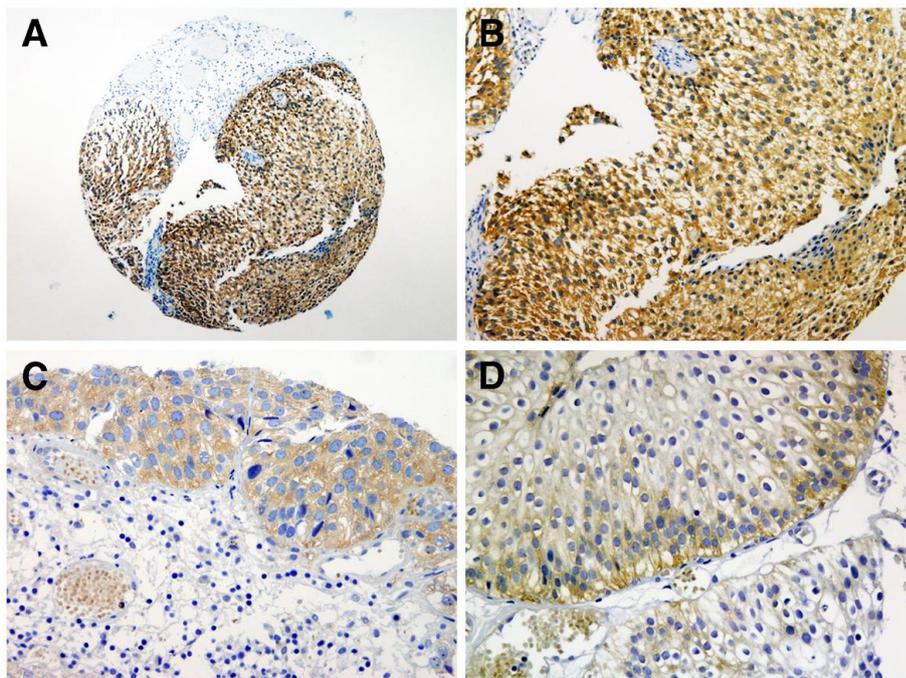


Figura 5 Coloração imunohistoquímica de COX2 em tecidos de tumor vesical. (A) ampliação de 20X; Coloração forte (B), moderada (C) e ligeira (D) em ampliação de 100X.[14]

No ano de 2014, T. Todenhofer et al.[15] colocou a hipótese de que o uso de vários marcadores moleculares de forma combinada ou passo a passo, aumentasse a detecção de recorrências de TNMIB. Assim, elaborou um estudo onde aplicou quatro reconhecidos marcadores (citologia urinária, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), imunocitologia (uCyt+) e NMP22 Elisa) de forma combinada e em degrau, numa amostra de 483 doentes em seguimento por TNMIB. No estudo obteve-se elevadas sensibilidades com a aplicação de dois ou mais marcadores, no caso da citologia+FISH atingiu o valor de 80,5%, com sensibilidade para tumores de alto grau de 94%. Ao analisar a aplicação de marcadores de forma combinada foram feitas análises de duas formas distintas: a primeira, considerando o teste positivo quando apenas um dos marcadores é positivo, levou à obtenção de elevadas sensibilidades e baixas especificidades; a segunda, considerando o teste positivo apenas quando os dois marcadores são positivos, originou elevadas especificidades mas baixas sensibilidades. Combinações de 3 marcadores conseguiram atingir sensibilidades de 95%, mas apenas uma das 4 possíveis obteve especificidade acima de 50%. O elevado custo da aplicação destes marcadores implica uma utilização racional dos mesmos, nomeadamente utilizando estratégias em degrau. O estudo concluiu que os testes aplicados permitem identificar tumores com elevada sensibilidade, sugerindo-se a realização de estudos prospetivos, de forma a tornar este teste aplicável a curto prazo[15].

III. Marcadores moleculares de progressão para carcinomas músculo invasivos

Cerca de 10 a 20% dos TNMIB progridem para carcinomas músculo invasivos[4]. Atualmente continua a não existir um método preciso para a identificação destes casos, sendo vários os trabalhos desenvolvidos com o intuito de descobrir marcadores capazes de prever a progressão dos TNMIB e adequar o seguimento desses doentes.

Um dos genes mais estudados pelo seu envolvimento no processo tumoral é o gene supressor tumoral P53. No carcinoma da bexiga não é exceção, encontrando-se sobre-expresso nas fases iniciais de doença e em 48% dos tumores Cis[5]. Vários estudos identificaram o P53 como indicador de progressão de TNMIB, com menores intervalos livres de progressão e sobrevivência relacionada com o cancro, no entanto há também estudos com resultados conflituosos ou sem expressão estatística (que se pode dever em grande parte às técnicas utilizadas pelos diversos estudos)[5]. Para além deste papel preditor de prognóstico, também a expressão de P53 é indicadora de resposta à terapêutica com bacilo de Calmette e Guérin (BCG)[5]. Estudos mais homogêneos e com maiores amostras devem ser realizados tendo em conta o potencial deste marcador molecular, no entanto já existem estudos com testes para potencial utilização a curto prazo.

Alterações epigenéticas são novamente estudadas na área da progressão neoplásica tendo em conta a sua possível relação com doença mais agressiva. Neste sentido, R. Kandimalla et al.[16] investigou o genoma em peças histológicas de carcinoma da bexiga, identificando uma correlação com progressão de TNMIB em vários genes anormalmente metilados: T-box 2, T-box-3, GATA 2 e membro 4 da família Zic. A Figura 6 revela o poder preditivo destas metilações, obtido durante o estudo. Mais ainda concluiu que, a adição dos referidos marcadores aos scores de risco da EORTC, levou a um incremento da precisão de previsão para progressão de 23,3% (passando de 72,7 para 96%). O autor sugere que a pesquisa destes marcadores melhore a estratificação dos doentes e leve a melhor adequação do tratamento e seguimento[16], sendo que a realização de estudos adicionais poderá levar à sua utilização clínica a médio prazo.

	Sensitivity	Specificity	NPV	PPV	AUC (p value)
TBX2	100	80	100	78	0.96 (0.0001)
TBX3	48	96	68	90	0.72 (0.019)
GATA2	94	71	93	74	0.88 (0.0001)
ZIC4	58	73	67	65	0.71 (0.021)

Figura 6 Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos 4 marcadores moleculares, para prever a progressão para doença invasiva.[16]

Outra via implicada no processo cancerígeno consiste na alteração dos MicroRNAs (miRNA), sequências não codificantes de RNA que controlam a expressão génica por repressão de alvos de mRNA específicos[17]. Os miRNAs são os mais fortes reguladores da expressão génica a nível pós-transcricional e já foi provada a sua implicação no processo tumoral a nível da bexiga[18]. Assim, foram vários os estudos publicados que focaram o papel dos vários tipos de miRNA. X. Wang et al[19] deu sequência ao seu trabalho com o miRNA-141 e avaliou a expressão deste nos tecidos de bexiga normal, TNMIB e tumores músculo invasivos, aferindo depois a sua relação com os parâmetros clínicos. No seu estudo concluiu que os doentes que expressam mais miRNA-141 têm melhor prognóstico, sugerindo este como um bom marcador para estratificação individual de risco de progressão de TNMIB[19]. Noutro estudo, Y Jia et al[17] demonstrou a relação do miRNA-126 com a ADAM9, metaloproteinase implicada na progressão de vários tumores. Nas amostras com baixos níveis de miRNA-126, a progressão para tumor invasivo aumentou. No inverso, os aumentos de miRNA-126 provocaram diminuição da expressão de ADAM9 e diminuição da progressão de TNMIB. Assim foi demonstrado o poder supressivo do miRNA-126, atestado o seu valor prognóstico e sugerida a sua possível utilização terapêutica[17]. Por último, M. Avgeris et al.[18] demonstrou que a associação miRNA-143/miRNA-145 apresenta expressão diminuída nos tecidos afetados por carcinoma da bexiga. A sua deteção aumenta o valor preditivo das tabelas de risco da EORTC, quando utilizadas em conjunto.

A amplificação do gene que codifica a proteína Her2 no cromossoma 17, leva a expressão aumentada da proteína e está descrita como implicada no cancro da mama[20]. Vários estudos investigaram a relação desta alteração com o carcinoma da bexiga, mas a maioria utilizou tecnologias de imunohistoquímica que gerou resultados controversos. P. Chen et al.[20] utilizou a FISH para avaliar a amplificação do gene HER2 e a expressão da proteína, bem como a correlação com recorrências e invasão, nos TNMIB. Os resultados demonstraram que a amplificação do gene Her2 apenas existe em 9% dos TNMIB de alto grau, originando neste subgrupo um comportamento muito agressivo, com recorrências e progressão mais frequentes. Desta forma os autores sugerem que a deteção da amplificação de Her2 utilizando a técnica FISH permite a seleção de um subgrupo de doentes com elevado risco de recorrência e progressão, adequando o tratamento necessário (terapêuticas anti-Her2 poderão ser eficazes)[20].

Outra proteína cuja expressão foi recentemente associado ao processo neoplásico (pulmão, mama, colon) é a proteína Ring box 1 (RBX1), cujo papel se prende com a ubiquitização de proteínas relacionadas com o ciclo celular[21]. Uma vez que as alterações do ciclo celular estão associadas ao carcinoma da bexiga, W. Wang et al.[21] investigou a relação da expressão desta proteína com a evolução de TNMIB. Nos seus resultados demonstrou um aumento da expressão desta proteína quando comparada com os tecidos normais, bem como um aumento da progressão para tumores invasivos nos doentes que a sobre-expressam (Figura 7). Sugere-se a realização de estudos mais consistentes para confirmar ou rejeitar a hipótese desta proteína se tornar um marcador molecular de prognóstico de TNMIB[21], a curto prazo não será um marcador molecular a ter em consideração.

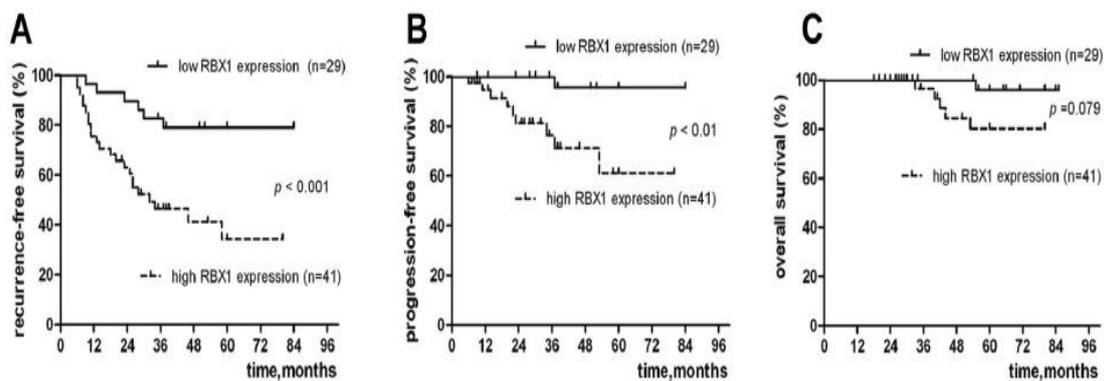


Figura 7 Curvas Kaplan-Meier de sobrevivência livre de recorrência (A), sobrevivência livre de progressão (B) e sobrevivência global, associadas há expressão de RBX1.[21]

As proteínas inibidoras da apoptose (IAP) são uma família de proteínas capazes de bloquear a via apoptótica por inibirem as caspases e antagonizarem a liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais[22]. A expressão exagerada destas proteínas está relacionada com a progressão cancerígena e a resistência à quimioterapia[22]. X. Che et al. investigou a expressão das proteínas inibidoras da apoptose celulares 1 e 2 (cIAP1 e cIAP2) nos TNMIB versus tecidos normais e a sua implicação a nível de prognóstico. Concluiu-se que a expressão destas proteínas está muito aumentada nos casos de TNMIB face ao grupo controlo, bem como a expressão nuclear de cIAP1 é preditiva de pior prognóstico e doença avançada, tornando este um marcador molecular com interesse clínico[22].

As caderinas, moléculas glicoproteicas transmembranares dependentes de cálcio, desempenham um papel importante na adesão celular e a sua expressão anormal está associada na literatura à progressão de vários tumores[23]. P. Wang et al. investigou a relação da expressão da P-Caderina e o comportamento de TNMIB numa amostra de 110 tecidos, concluindo que a sobre-expressão desta proteína está associada a uma maior taxa de progressão para tumores invasivos (Figura 8), sendo uma boa candidata a estudo para validação como marcador de prognóstico de uso corrente na prática clínica[23].

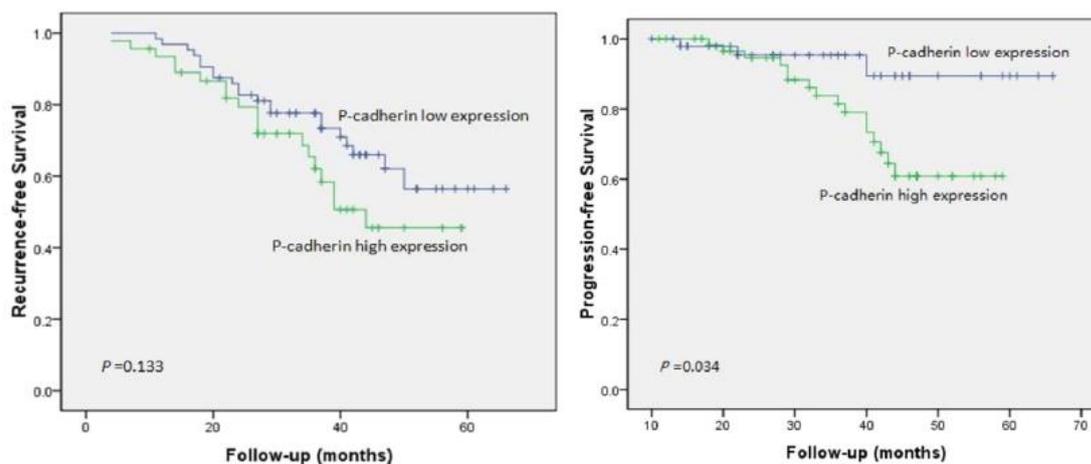


Figura 8 Sobrevivência livre de recorrência e de progressão, em indivíduos com baixa e elevada expressão de P-Caderina.[23]

Com outro tipo de abordagem H. Chung et al.[24] pretendeu aferir as diferenças entre o perfil de expressão de proteínas em tecidos normais e em tecidos com carcinoma da bexiga. Foram encontradas 12 proteínas cuja expressão se encontrava alterada entre doentes e controlos, sendo que a proteína *Cofilin* apresentou a diferença mais significativa[24]. Para ter atividade, esta proteína precisa de ser fosforilada, essa particularidade foi investigada tendo sido descoberta maior proporção entre proteína fosforilada/proteína não fosforilada nas amostras de TNMIB. Adicionalmente foi descrito o papel que a *cofilin* desempenha a nível da migração celular e comprovada a sua participação no processo de invasão do carcinoma da bexiga[24]. A expressão desta proteína poderá ser tida como marcador de progressão em TNMIB, embora sejam necessários trabalhos adicionais que não permitem a sua utilização num futuro próximo.

Discussão

Até à data, nenhum marcador molecular pode ser utilizado clinicamente para estabelecer diagnóstico, prever a progressão ou a recorrência de TNMIB[1]. As *Guidelines* da Associação Europeia de Urologia para o Cancro da Bexiga[2] dedicam uma secção à previsão de recorrência e progressão dos TNMIB, estabelecendo as tabelas de risco da EORTC como o melhor fator preditor. Estas tabelas são baseadas nos seis fatores clínicos e patológicos mais significantes: número de tumores, diâmetro do tumor, taxa de recorrência anterior, categoria, presença de Cis e grau[2]. Contudo, este continua a não ser um sistema preciso e rigoroso, encontrando-se sugerido nas próprias *guidelines* a elaboração de trabalhos de validação de marcadores moleculares, de forma a aumentar a precisão das tabelas já existentes[2].

Recentemente surgem trabalhos científicos que apresentam evidência da capacidade preditiva de diversos marcadores moleculares, principalmente quando utilizados em conjunto com as características clínicas e patológicas fornecidas pelas tabelas de risco EORTC[5]. Um marcador molecular só é útil na prática clínica se aumentar a precisão diagnóstica face aos elementos já conhecidos e aprovados, permitindo adequar o tratamento e seguimento de forma individual[1].

Neste sentido demonstrou-se o aparecimento de estudos ligando vários marcadores moleculares, que vão desde alterações cromossómicas e epigenéticas, reguladores do ciclo celular, recetores da tirosina-cinase, passando por reguladores da apoptose, entre outros, com a previsão de recorrência e progressão de TNMIB e até mesmo com o estabelecimento do diagnóstico inicial.

Apesar da maioria dos estudos se focar apenas num marcador molecular específico, existem alguns trabalhos a focar-se na aplicação de marcadores de forma combinada ou em degrau[15]. Esta abordagem demonstra vantagens a nível da sensibilidade dos testes aplicados

(embora a especificidade seja importante para prevenir falsos positivos, no contexto de seguimento elevadas sensibilidades demonstram vantagem pelo menor risco de falsos negativos[15]), bem como a nível de custos, ao utilizar os marcadores em degrau e evitar doseamentos desnecessários.

Contudo ainda um longo caminho separa as evidências publicadas, de uma utilização na prática clínica. São várias as razões que apontam neste sentido, entre as quais: a elevada heterogeneidade dos estudos apresentados, que leva muitas vezes à não reprodutibilidade dos resultados; a ausência de processos de validação rigorosos, sendo a maioria dos estudos retrospectivos e de centro único (quando idealmente deveriam ser prospetivos e multicentro); a avaliação de risco com base em parâmetros clínicos e patológicos prontamente disponíveis; e amostras pouco significativas.

A evidência atual demonstra que poderão ser introduzidos marcadores moleculares a médio prazo, que funcionem em conjunto com as tabelas de risco da EORTC, aumentando a precisão da sua estratificação. A sua utilização de forma isolada, quer para estabelecer diagnóstico, quer como alternativa à cistoscopia durante o seguimento, parece muito distante. Assim, não é exetável que a curto prazo haja a introdução de marcadores moleculares na prática clinica corrente, tendo em conta a ausência de estudos com força estatística suficiente para os validarem.

Conclusão

Atualmente continua a não ser aceite a utilização de marcadores moleculares para estabelecimento de diagnóstico de carcinoma da bexiga, nem como alternativa à cistoscopia durante o seguimento dos doentes. Contudo, os tempos de intervalo entre cistoscopias continuam a ser controversos, o método continua a ser pouco aceite pelos doentes e os custos são consideráveis[15].

Assim não se devem desvalorizar os trabalhos que têm vindo a ser apresentados, pelo contrário é necessário o desenvolvimento de mais estudos, prospetivos, com população homogénea e de número estatisticamente significativo, de forma a poder validar definitivamente alguns destes marcadores como preditores do prognóstico e introduzi-los na prática clínica corrente. Dessa forma poderá ser criada uma ferramenta de estratificação de doentes de forma mais precisa, individualizar terapêuticas e tempos de seguimento, melhorando assim o prognóstico do doente com carcinoma da bexiga.

Referências Bibliográficas

- [1] N. Fristrup, B. P. Ulhøi, K. Birkenkamp-Demtröder, F. Mansilla, M. Sanchez-Carbayo, U. Segersten, P.-U. Malmström, A. Hartmann, J. Palou, M. Alvarez-Múgica, K. Zieger, M. Borre, T. F. Ørntoft, and L. Dyrskjøt, “Cathepsin E, maspin, Plk1, and survivin are promising prognostic protein markers for progression in non-muscle invasive bladder cancer,” *Am. J. Pathol.*, vol. 180, no. 5, pp. 1824–1834, 2012.
- [2] W. Oosterlinck, B. Lobel, G. Jakse, P. U. Malmström, M. Stöckle, C. Sternberg, and Others, “Guidelines on Bladder Cancer• 1,” *Eur. Urol.*, vol. 41, no. 2, pp. 105–112, 2015.
- [3] O. Cussenot, K. Sighar, M. Mohammed, S. Hugonin, V. Ondet, S. Larre, R. Lacave, M. Roupret, and G. Cancel-Tassin, “Detection of specific chromosomal aberrations in urine using BCA-1 (oligo-CGH-array) enhances diagnostic sensitivity and predicts the aggressiveness of non-muscle-invasive bladder transitional cell carcinoma.,” *World J. Urol.*, vol. 32, no. 2, pp. 551–7, 2014.
- [4] X. Jin, S. J. Yun, P. Jeong, I. Y. Kim, W.-J. Kim, and S. Park, “Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics.,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 6, pp. 1635–45, 2014.
- [5] F. Sanguedolce, P. Bufo, G. Carrieri, and L. Cormio, “Predictive markers in bladder cancer: do we have molecular markers ready for clinical use?,” *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 51, no. 5, pp. 291–304, 2014.
- [6] Y. Nitta, H. Konishi, T. Makino, T. Tanaka, H. Kawashima, J. L. Iovanna, T. Nakatani, and H. Kiyama, “Urinary levels of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein as a diagnostic biomarker in patients with bladder cancer.,” *BMC*

- Urol.*, vol. 12, no. 1, p. 24, 2012.
- [7] R. Morgan, R. T. Bryan, S. Javed, F. Launchbury, M. P. Zeegers, K. K. Cheng, N. D. James, D. M. A. Wallace, C. D. Hurst, D. G. Ward, M. A. Knowles, and H. Pandha, “Expression of Engrailed-2 (EN2) protein in bladder cancer and its potential utility as a urinary diagnostic biomarker,” *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 9, pp. 2214–2222, 2013.
- [8] D. Kanojia, M. Garg, S. Saini, S. Agarwal, D. Parashar, N. Jagadish, A. Seth, A. Bhatnagar, A. Gupta, R. Kumar, N. K. Lohiya, and A. Suri, “Sperm associated antigen 9 plays an important role in bladder transitional cell carcinoma,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, 2013.
- [9] K. Zhang, B. Zhou, P. Zhang, Z. Zhang, P. Chen, Y. Pu, Y. Song, and L. Zhang, “Prognostic value of serum nicotinamide phosphoribosyltransferase in patients with bladder cancer.,” *Croat. Med. J.*, vol. 55, no. 5, pp. 507–13, 2014.
- [10] W. Ding, Y. Gou, C. Sun, G. Xia, H. Wang, Z. Chen, J. Tan, K. Xu, and D. Qiang, “Ki-67 is an independent indicator in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC); Combination of EORTC risk scores and Ki-67 expression could improve the risk stratification of NMIBC,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 32, no. 1, 2014.
- [11] L. Wang, C. Feng, G. Ding, Q. Ding, Z. Zhou, H. Jiang, and Z. Wu, “Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 4, pp. 2989–2995, 2014.
- [12] J.-G. Ma, “Aberrant Methylation of CDH13 is a Potential Biomarker for Predicting the Recurrence and Progression of Non Muscle Invasive Bladder Cancer,” *Med. Sci. Monit.*, vol. 20, pp. 1572–1577, 2014.
- [13] J. Wang, X. Zhang, P. Wei, J. Zhang, Y. Niu, N. Kang, Y. Zhang, W. Zhang, and N.

- Xing, “Livin, Survivin and Caspase 3 as early recurrence markers in non-muscle-invasive bladder cancer,” *World J. Urol.*, vol. 32, no. 6, pp. 1477–1484, 2014.
- [14] T. Tadin, K. Krpina, S. Stifter, E. Babarović, Z. Fučkar, and N. Jonjić, “Lower cyclooxygenase-2 expression is associated with recurrence of solitary non-muscle invasive bladder carcinoma,” *Diagn. Pathol.*, vol. 7, p. 152, 2012.
- [15] T. Todenhofer, J. Hennenlotter, M. Esser, S. Mohrhardt, S. Aufderklamm, J. Böttge, S. Rausch, J. Mischinger, S. Bier, G. Gakis, U. Kuehs, A. Stenzl, and C. Schwentner, “Stepwise Application of Urine Markers to Detect Tumor Recurrence in Patients Undergoing Surveillance for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer,” *Dis. Markers*, vol. 2014, 2014.
- [16] R. Kandimalla, A. A. G. Van Tilborg, L. C. Kompier, D. J. P. M. Stumpel, R. W. Stam, C. H. Bangma, and E. C. Zwarthoff, “Genome-wide analysis of CpG Island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers,” *Eur. Urol.*, vol. 61, no. 6, pp. 1245–1256, 2012.
- [17] a Y. Jia, M. Castillo-Martin, D. M. Bonal, M. Sánchez-Carbayo, J. M. Silva, and C. Cordon-Cardo, “MicroRNA-126 inhibits invasion in bladder cancer via regulation of ADAM9,” *Br. J. Cancer*, no. April, pp. 2945–2954, 2014.
- [18] M. Avgeris, K. Mavridis, T. Tokas, and K. Stravodimos, “Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment,” 2015.
- [19] X.-L. Wang, H.-Y. Xie, C.-D. Zhu, X.-F. Zhu, G.-X. Cao, X.-H. Chen, and H.-F. Xu, “Increased miR-141 expression is associated with diagnosis and favorable prognosis of patients with bladder cancer,” *Tumor Biol.*, vol. 36, pp. 877–883, 2014.

- [20] P. C.-H. Chen, H.-J. Yu, Y.-H. Chang, and C.-C. Pan, “Her2 amplification distinguishes a subset of non-muscle-invasive bladder cancers with a high risk of progression.,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 66, no. 2, pp. 113–9, 2013.
- [21] W. Wang, J. Qiu, Z. Liu, Y. Zeng, J. Fan, Y. Liu, and Y. Guo, “Overexpression of RING box protein-1 (RBX1) associated with poor prognosis of non-muscle-invasive bladder transitional cell carcinoma,” *J. Surg. Oncol.*, vol. 107, no. 7, pp. 758–761, 2013.
- [22] X. Che, D. Yang, H. Zong, J. Wang, X. Li, F. Chen, X. Chen, and X. Song, “Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage- and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 30, no. 4, pp. 450–456, 2012.
- [23] P. Wang, S. L. Lin, L. H. Zhang, Z. Li, Q. Liu, J. X. Gao, D. M. Liu, J. J. Bo, and Y. R. Huang, “The prognostic value of P-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer.,” *Eur. J. Surg. Oncol.*, vol. 40, no. 3, pp. 255–9, 2014.
- [24] H. Chung, B. Kim, S.-H. Jung, K.-J. Won, X. Jiang, C.-K. Lee, S. D. Lim, S.-K. Yang, K. H. Song, and H. S. Kim, “Does phosphorylation of cofilin affect the progression of human bladder cancer?,” *BMC Cancer*, vol. 13, no. 1, p. 45, 2013.