

Carla Sofia Domingues Pereira

“Via de sinalização mTOR no carcinoma urotelial da bexiga”

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Carla Sofia Domingues Pereira

“Via de sinalização mTOR no carcinoma urotelial da bexiga”

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Carla Sofia Domingues Pereira

“Via de sinalização mTOR no carcinoma urotelial da bexiga”

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Análises Laboratoriais Especializadas.

(Carla Sofia Domingues Pereira)

Porto, 2014

Resumo

Mundialmente, o cancro da bexiga (CB) é o 7º tipo de cancro mais frequente em homens e o 17º mais frequente em mulheres. É uma doença com etiologia multifatorial associada a vários agentes ambientais e genéticos, dos quais o tabagismo é o fator de risco mais importante. Os carcinomas uroteliais da bexiga (CUBs) são geralmente superficiais em 70% a 80% dos pacientes e invasores em 20% a 30%. Os CUBs não-invasores têm uma alta taxa de recorrência e progressão e os invasores e metastáticos representam a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com CB.

A via fosfatidilinositol-3cinase (PI3K) /AKT (Proteína cinase b) -alvo da rapamicina em mamíferos (m-TOR) é uma importante via envolvida no crescimento celular, tumorigênese, invasão celular e resposta a drogas. Esta via é frequentemente ativada em muitas neoplasias e o descontrolo da sinalização PI3K-AKT-mTOR no CB pode contribuir para o crescimento do tumor, angiogénese e metastização.

Neste trabalho, foram estudados 96 casos de tumores diagnosticados como CUBs de vários graus e estádios e foi avaliada a imunoexpressão do *phospho*-mTOR (Ser2448) e do *phospho*-S6 (Ser235/236).

Em relação à expressão do p-mTOR verificou-se que mais de 50% dos casos de CUB não apresentavam ou apresentavam uma baixa expressão desta proteína sendo que não foi encontrada associação deste com estádio ou grau de diferenciação tumoral. Em relação à proteína p-S6 a sua expressão nos CUB foi igualmente nula ou baixa, no entanto encontrou-se uma associação estatisticamente significativa com o estádio e grau de diferenciação, em duas formas de avaliação qualitativa.

Estes dois marcadores imunohistoquímicos, quando analisados em conjunto apresentaram uma correlação positiva moderada nos CUB, no entanto, estudos futuros são necessários para avaliar a sua validade como marcadores biológicos e, eventualmente, alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Carcinoma urotelial da bexiga, mTOR, S6, rapamicina, prognóstico.

Abstract

Worldwide, bladder cancer (BC) is the 7th most frequent type of cancer in men and the 17th most common in women. It is a disease with multifactorial etiology associated with multiple genetic and environmental agents, of which smoking is the most important risk factor. The urothelial carcinomas of the bladder (CUBs) are generally superficial in 70% to 80% of patients and invasive in 20% to 30%. The non-invasive CUBs have a high rate of recurrence and progression, and the metastatic and invaders ones are the leading cause of morbidity and mortality among patients with CB.

The 3 cinase via phosphatidylinositol PI3K/AKT (cinase protein b) target of rapamycin in mammals (m-TOR) is an important pathway involved in cell growth, tumorigenesis, cell invasion and drug response. This pathway is frequently activated in many tumors and uncontrollable signaling PI3K/AKT/mTOR pathway in BC may contribute to tumor growth, angiogenesis and metastasis.

In this study, 96 cases of tumors diagnosed as CUBs of various grades and stages were studied, and it was evaluated the immunoreactivity of phospho-mTOR (Ser2448) and phospho-S6 (Ser235/236).

Concerning the p-mTOR expression, it was observed that more than 50% of CUB didn't express or had a low expression of this protein, and it wasn't found any association between this and the state or grade of the tumor. In what concerns the p-S6 protein, it was equally low or absent its expression in the CUB, although it was found a statistical association with the state and grade of the tumor, in two forms of qualitative evaluation.

When analyzed, together, these two markers presented a positive moderated correlation in the CUB, however future studies are necessary to access its validity as biological markers and, eventually, therapeutic targets.

Keywords: urothelial carcinoma of the bladder, mTOR, S6, rapamycin, prognosis.

À minha família, em especial aos meus filhos Afonso e Dinis, por serem os meus pilares, a minha fonte de inspiração...

Agradecimentos

A realização desta dissertação foi como subir ao topo de uma montanha, muitas vezes pensei que não seria capaz, várias vezes pensei em desistir mas acreditei ser possível e consegui....

Esta jornada não a fiz sozinha, e gostaria de deixar aqui um simbólico mas muito sincero apreço a todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente.

Sem ordem específica, agradeço:

À minha orientadora Doutora Céu Costa, pelo grande apoio, competência e disponibilidade.

À Professora Doutora Sandra Clara, pela sua opinião construtiva e disponibilidade.

À Doutora Amélia França, por toda a disponibilidade, simpatia e apoio informático.

À Sandrinha, por acreditar em mim, pelo apoio incondicional, carinho e amizade.

Ao Daniel por acreditar em mim.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, pela motivação e força anímica que sempre me transmitiram.

Às minhas irmãs pelo apoio e disponibilidade para com os meus filhos, sem elas não teria conseguido.

Aos meus filhos, simplesmente por existirem.

A todos o meu muito obrigada....

Índice

I – Introdução	20
1.1 - Epidemiologia	21
1.2 - Fatores de Risco	27
1.2.1 - Tabagismo.....	27
1.2.2 - Exposição ocupacional.....	27
1.2.3 – Ambientais	28
1.2.4 - Fármacos	28
1.2.5 - Infecções	29
1.2.6 - Genéticos.....	29
1.2.7 - Outros.....	29
1.3 - Sintomas/ Diagnóstico.....	30
1.3.1 - Sintomas.....	30
1.3.2 - Diagnóstico	30
1.4 - Classificação histológica dos tumores da bexiga	33
1.5 – Tratamentos	38
1.6 - mTOR.....	40
1.6.1 - Via de sinalização mTOR	41
1.6.2 - Sinalização a montante do mTOR	43
1.6.2.1 - PI3K/AKT	43
1.6.2.2 - PTEN.....	44

1.6.2.3 - AKT1.....	44
1.6.2.4 - TSC	45
1.6.3 - Sinalização a jusante do mTOR.....	45
1.6.4 - Via mTOR no Cancro	46
1.6.5 - Via de sinalização mTOR no CUB.....	48
1.6.6 - Inibidores do mTOR	49
II- Objetivos	53
III- Material e Métodos.....	54
3.1 - População	54
3.2 - Estudo imunohistoquímico.....	54
3.3 - Avaliação e quantificação da imunorreatividade	55
3.4 - Análise estatística.....	56
IV – Resultados	57
4.1 Características clinico-patológicas	57
4.2 Expressão da proteína p-mTOR	58
4.2.1 Associação da proteína p-mTOR com o estágio e grau	60
4.3 Expressão da proteína p-S6	63
4.3.1 Associação da proteína p-S6 com o estágio e grau de diferenciação.....	65
4.4 Correlação entre o p-mTOR e p-S6.....	68
V- Discussão e Conclusão.....	69
VI – Bibliografia	72

Anexos.....	80
--------------------	-----------

Índice de Figuras

Fig. 1 – Epitélio da bexiga (adaptada (Puzio-Kuter, <i>et alii</i> . 2009))	33
Fig. 2 – Ilustração da extensão da invasão tumoral (Adaptada - <i>Repositorio.hff.min-saude.pt</i> - Tumor da Bexiga. Visão do urologista. Bruno Graça).	35
Fig. 3 – Composição dos complexos mTOR (adaptada (Bhaskar e Hay, 2007)).	41
Fig. 4 – Via de sinalização do mTOR (adaptada (Efeyan e Sabatini 2010)).	43
Fig. 5 – Via de sinalização mTOR simplificada e a atuação da rapamicina (adaptada (Laplante e Sabatini 2012))	50
Fig. 6 – Imunorreatividade da proteína p-mTOR no carcinoma da bexiga. Ampliação 100x	82
Fig. 7 – Imunorreatividade da proteína p-S6 no carcinoma da bexiga. Ampliação 100x	83

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estimativa e previsão da incidência de Cancro da Bexiga na União Europeia (UE-27) (Adaptada Globocan 2008)	24
Tabela 2 – Estimativa e previsão de mortes por Cancro da Bexiga na União Europeia (UE-27) (Adaptada Globocan 2008)	24
Tabela 3 – Estimativa e previsão da incidência de Cancro da Bexiga em Portugal (Adaptada Globocan 2008).....	26
Tabela 4 – Estimativa e previsão de mortes por Cancro da Bexiga em Portugal (UE-27) (Adaptada Globocan 2008).....	26
Tabela 5 – Classificação do carcinoma vesical TNM de 2009 (Adaptada de Babjuk <i>et alii.</i> 2014, Witjes <i>et alii.</i> 2014).....	36
Tabela 6 – Classificação da OMS de 1973 e 2004 (Adaptada de Babjuk <i>et alii.</i> 2014, Witjes <i>et alii.</i> 2014).	37
Tabela 7 – Recomendações de tratamento em tumores TaT1 de acordo com a estratificação de risco (Adaptada de Babjuk <i>et alii.</i> 2013).....	39
Tabela 8 – Os proto-oncogenes e genes supressores de tumor ligados ao mTOR (Adaptada (Pópulo, Lopes e soares, 2012)).....	47
Tabela 9 – Grupos formados para avaliação da positividade das células.....	55
Tabela 10 – Grupos formados para avaliação da intensidade da marcação	56
Tabela 11 - Parâmetros clinico-patológicos da amostra estudada (n=96).....	57
Tabela 12 - Grau de diferenciação e estádios dos CUBs estudados.	58
Tabela 13 – Frequência da percentagem de células marcadas da proteína p-mTOR. ...	59
Tabela 14 – Frequência da intensidade de marcação da proteína p-mTOR.	59
Tabela 15 – Percentagem de célula marcadas com p-mTOR nos diferentes estádios...	60

Tabela 16 - Intensidade da marcação imunohistoquímica do p-mTOR nos diferentes estádios.	61
Tabela 17 - <i>Hscore</i> do marcador p-mTOR em função do estádio.....	61
Tabela 18 - Percentagem de células positivas com o marcador p-mTOR em função do grau de diferenciação.....	62
Tabela 19 - Intensidade da marcação p-mTOR em função do grau de diferenciação... ..	62
Tabela 20 - <i>Hscore</i> da marcação p-mTOR em função do grau de diferenciação.....	63
Tabela 21 - Frequência da percentagem de células marcadas da proteína p-S6.....	63
Tabela 22 - Frequência da intensidade de marcação da proteína p-S6.....	64
Tabela 23 - Percentagem de célula marcadas com p-S6 nos diferentes estádios.	65
Tabela 24 - Intensidade da marcação imunohistoquímica do p-S6 nos diferentes estádios.	65
Tabela 25 - <i>Hscore</i> do marcador p-S6 em função do estádio.....	66
Tabela 26 - Percentagem de células positivas com o marcador p-S6 em função do grau de diferenciação.....	67
Tabela 27 - Intensidade da marcação p-S6 em função do grau de diferenciação.....	67
Tabela 28 - <i>Hscore</i> da marcação p-S6 em função do grau de diferenciação.....	68
Tabela 29 - Coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e valor p entre p-mTOR e p-S6	68

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Frequência das diversas categorias do *Hscore*..... 60

Gráfico 2 - Frequência das diversas categorias do *Hscore*..... 64

Índice de Anexos

Anexo I - Protocolo de Imunohistoquímica	81
Anexo II - Imunorreatividade do p-mTOR	82
Anexo III - Imunorreatividade do p-S6	83

Abreviaturas

AKT	Proteína cinase b
AMPK	Proteína cinase ativada por 5' adenosina monofosfato
BTA	Antigénio tumoral da bexiga
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
CB	Cancro da bexiga
Cis	Carcinoma <i>in situ</i>
CUB	Carcinoma urotelial da bexiga
ADN	Ácido desoxirribonucleico
4EBP1	Proteína de ligação 1
EGF	Fator de crescimento epitelial humano
EIF4E	Inibidor do fator de iniciação eucariótica 4E
FGFR	Recetor do fator de crescimento fibroblástico
FDP	Ensaio do produto de degradação da fibrina
FKBP12	Complexo rapamicina – proteína intracelular associada à FK506

GTP	Guanina trifosfato
GTPase	Guanina trifosfatase
HA-	Teste ácido hialurónico
HAase	Hialuronidase na urina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IH	Imunohistoquímica
MAPK	Cascata das proteínas cinase ativadas por mitogéno
mSin1	Proteína cinase ativada por mitogéneos associada à proteína 1
mTOR	Proteína cinase serina/treonina alvo da rapamicina em mamíferos
NMP	Teste de proteína nuclear de matriz
OMS	Organização mundial de saúde
PDD	Diagnóstico fotodinâmico
PKD1	Proteína 3 – fosfoinositida dependente cinase
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	Gene supressor tumoral homólogo da fosfatase e tensina
Raptor	Proteína reguladora associada ao mTOR
Ras	Proteína de ligação GTP
Rictor	Não sensível a rapamicina
Rheb	Proteína homóloga de Ras enriquecida no cérebro
RM	Ressonância magnética
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RORENO	Registo oncológico regional do Norte
RTUB	Ressecção Transuretral da Bexiga
SAPK	Proteína cinase induzida por stress
S6K1	Cinase serina/treonina
TC	Tomografia computadorizada
TMA	Tissue microarrays
TNM	Tumor, nódulo, metástase

TSC Complexo tuberoso / esclerose

USA Estado Unidos da América

UE União Europeia

I – Introdução

O cancro da bexiga (CB) é o quinto tipo de cancro mais frequente no mundo, com uma estimativa de 357.000 novos casos e 145.000 mortes em 2010 (Nawroth *et alii*, 2011). Esta neoplasia maligna é uma das mais comuns na Europa, nos Estados Unidos e nos países do Norte de África (Vishnu, Mathew e Tan, 2011). É o quarto cancro mais frequentemente diagnosticado em homens, com uma taxa de incidência de masculino para feminino de 3:1 (Chen *et alii*, 2009), surgindo mais comumente na sétima década de vida (Letasiová *et alii*, 2012). Ocorre em várias formas, sendo o carcinoma urotelial da bexiga (CUB), a mais frequente representando mais de 90% de todos os CB (Hansel *et alii*, 2010).

A principal causa de CB é o tabagismo, responsável por cerca de 50% dos casos em países desenvolvidos. Existe um vínculo forte entre a quantidade e a duração do hábito de fumar cigarro. O maior risco de CB tem sido observado em trabalhadores expostos a algumas aminas aromáticas. Beber água da torneira com subprodutos de cloro ou arsénico, a exposição a certas drogas, como a ciclofosfamida, utilizada em quimioterapia, o elevado consumo de analgésicos contendo fenacetina, foi demonstrado que provoca CB em seres humanos (Jankovic e Radosavljevic, 2007; Wu *et alii.*, 2008). O risco genético está a crescer de forma constante e é duas vezes maior em parentes de primeiro grau de pacientes com CUB (Burger *et alii*, 2013).

A histologia do CUB é variável; a maioria dos tumores T1 são papilares, de baixo ou alto grau e os T2-T4 são carcinomas não papilares de alto grau (Eble *et alii*, 2004). A natureza recidivante do CUB representa um enorme fardo sobre os sistemas de cuidados de saúde. Aproximadamente 75% dos CUBs recém-diagnosticados são não-invasores e têm uma alta taxa de recorrência e progressão, apesar da terapêutica local. Os restantes 25% de CUBs apresentam invasão muscular e precisam de cirurgia radical ou radioterapia, mas ainda têm resultados pobres, mesmo com terapia sistémica (Burger *et alii*, 2013). Apesar dos recentes avanços no tratamento multidisciplinar, o CUB continua a atingir taxas de mortalidade e morbidade inaceitavelmente altas, com uma

taxa de sobrevivência de 10 anos em 40% a 50% dos casos (Schultz *et alii*, 2010). Como se pode constatar, o CB continua a ser um grave problema de saúde pública.

Aproximadamente 30 a 50% dos pacientes com CUB invasor desenvolve a doença metastática e morre no prazo de 2 anos após diagnóstico. Além disso, praticamente todos os pacientes com diagnóstico de metástases à distância vão sucumbir à doença. Atualmente, a modalidade padrão de tratamento para CUB invasor é cistectomia radical e a quimioterapia sistêmica é geralmente reservada para pacientes com doença metastática, no entanto estes regimes de tratamento fornecem apenas um benefício limitado e são raros os casos de remissão completa. À luz destes resultados clínicos, a identificação de novos alvos terapêuticos é necessária para definir as potenciais vias de tratamento adicional para esses pacientes (Hansel *et alii*, 2010).

A via PI3K/AKT /mTOR é uma importante via de sinalização envolvida no crescimento celular, tumorigênese, invasão celular e resposta à droga. Esta via é frequentemente ativada em muitas neoplasias e o descontrole da sinalização PI3K/AKT/mTOR reflete-se num mau prognóstico no cancro do pulmão, colo do útero, ovário e esófago. No CB, foi relatado que esta via pode regular a invasão do tumor, portanto há hipótese de que variações genéticas nesta via podem afetar a sobrevivência dos pacientes. Não há muitos estudos que avaliem a associação entre variações de linha germinativa na via PI3K/AKT/mTOR e os resultados clínicos de CB (Chen *et alii*, 2010).

1.1 - Epidemiologia

Segundo Nóbrega *et alii* (2013), o cancro é um problema de saúde pública mundial, que tem vindo a aumentar, em grande parte, devido ao envelhecimento da população, em paralelo com a crescente exposição a alguns fatores de risco, nomeadamente o tabaco. Cerca de 12,7 milhões de casos de cancro e 7,6 milhões de mortes a ele associadas ocorreram em 2008; destes, 56% dos casos e 64% das mortes ocorreram nos países em desenvolvimento económico (Jemal *et alii*, 2011).

Globalmente, a cada ano, cerca de 400 000 novos pacientes são diagnosticados com (CB) e mais de 150 000 morrem da doença (Rafnar *et alii*, 2011). Este tem uma

prevalência cinco vezes maior entre os homens do que entre as mulheres (Goodison, Rosser e Urquidi, 2013), com taxas mais elevadas em caucasianos do que em não-caucasianos (Cancer Research UK) e a idade média de diagnóstico é 65 anos (Goodison, Rosser, e Urquidi, 2013). Há uma variação da taxa de incidência internacional do CB de 14 vezes. As taxas mais elevadas encontram-se nos países da Europa, América do Norte e Norte de África (Jemal *et alii*, 2011; Vishnu, Mathew e Tan, 2011). Homens egípcios têm a maior taxa de mortalidade (16,3 por 100.000), que é duas vezes maior do que a taxa mais elevada na Europa (8,3 em Espanha e 8,0 na Polónia) e quatro vezes mais elevada do que nos Estados Unidos da América (USA) - 3,7 (Jemal *et alii*, 2011; Joshi e Preslan, 2011). As taxas mais baixas são encontradas na Melanésia e África central (Vishnu, Mathew e Tan, 2011).

Mundialmente, o CB é o 7º tipo de cancro mais frequente em homens e o 17º mais frequente em mulheres (Kakehi *et alii*, 2010; Burger *et alii*, 2013). Os carcinomas uroteliais da bexiga (CUBs) são geralmente superficiais em 70% a 80% dos pacientes e invasores em 20% a 30%. Os tumores invasores e metastáticos representam a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com CB (Nóbrega *et alii*, 2013).

Nos USA e na Europa Ocidental, um em cada vinte e cinco homens e uma em cada oitenta mulheres irá desenvolver CB ao longo da vida (Rafnar *et alii*, 2011). Dados a partir de 2009 indicam que mais de meio milhão de pessoas nos USA vivem com o diagnóstico de CB (Joshi e Preslan, 2011).

Nos países desenvolvidos mais de 90 % dos tumores da bexiga derivam do epitélio urotelial, sendo denominados de CUB, 5% são carcinomas de células escamosas, e menos do que 2 % são adenocarcinomas (Chou e Dana, 2010). Cerca de 75% dos pacientes apresentam doença não-músculo-invasiva em estágio Ta (carcinoma papilar não invasor), CIS (carcinoma in situ) ou T1 (tumor que invade o tecido conjuntivo, mas não a camada muscular da bexiga). Embora tenham uma sobrevivência prolongada, estes pacientes sofrem de uma alta taxa de recorrência do tumor (Joshi e Preslan, 2011).

Na Europa, desde 1990, foram observados declínios das taxas de mortalidade, em parte, devido a uma redução na prevalência do tabagismo e redução de exposições

ocupacionais conhecidas por causar CB (Jemal *et alii*,2011), mas ainda está a aumentar em alguns países da Europa Oriental (Pelucchi *et alii*, 2006). Entre 1999-2001 e 2008-2010, as taxas de incidência europeia diminuíram 23% em homens e 21% em mulheres (Cancer Research UK).

Com base nas estimativas GLOBOCAN 2008, prevê-se que em 2015 surjam na União Europeia 120 414 novos casos de CB (Tabela 1) e 43 797 mortes por esta neoplasia maligna (Tabela 2).

Tabela 1 – Estimativa e previsão da incidência de Cancro da Bexiga na União Europeia (UE-27) (Adaptada Globocan 2008).

Ano	Número estimado de novos cancros (todas as idades)	Masculino	Feminino	Ambos os sexos
2008		83876	23543	107419
	Idade <65	23267	5463	28730
	Idade >= 65	60609	18080	78689
2015		94649	25765	120414
	Idade <65	25192	5818	31010
	Idade >= 65	69457	19947	89404
	As alterações demográficas	10773	2222	12995
	Idade <65	1925	355	2280
	Idade >= 65	8848	1867	10715

Previsões demográficas extraídas da *Nações Unidas, World Population Prospects, revisão de 2008*.

Os números são calculados usando taxas de idade específicas e populações correspondentes por 10 grupos de idade.

Tabela 2 – Estimativa e previsão de mortes por Cancro da Bexiga na União Europeia (UE-27) (Adaptada Globocan 2008).

Ano	Número estimado de mortes por cancro (todas as idades)	Masculino	Feminino	Ambos os sexos
2008		28665	9976	38641
	Idade <65	4523	1118	5641
	Idade >= 65	24142	8858	33000
2015		32779	11018	43797
	Idade <65	4924	1201	6125
	Idade >= 65	27855	9817	37672
	As alterações demográficas	4114	1042	5156
	Idade <65	401	83	484
	Idade >= 65	3713	959	4672

Previsões demográficas extraídas da *Nações Unidas, World Population Prospects, revisão de 2008*.

Os números são calculados usando taxas de idade específicas e populações correspondentes por 10 grupos de idade

No Reino Unido, em 2010 foram diagnosticados 10.324 novos casos de CB, 7.416 em homens e 2.908 em mulheres, refletindo uma relação masculino: feminino de quase 26:10. O CB é o sétimo tipo de cancro mais comum, o que representa 3% de todos os novos casos. Nos homens, é a quarta neoplasia mais frequente e nas mulheres a 11^a. (Cancer Research UK).

Em Portugal, o Registo oncológico é realizado por três Registos Oncológicos Regionais, Norte, Centro e Sul, criados pela portaria governamental n° 35/88 de 16 de Janeiro e são responsáveis pelo registo de novos casos de cancro diagnosticados em cada ano, de acordo com a residência de cada doente.

Segundo o Registo Oncológico Nacional (Norte, Centro e Sul com exceção do Registo Oncológico da Região Autónoma dos Açores que não dispunha ainda de toda a informação sobre a Região à datada publicação), em 2005, foram diagnosticados em Portugal 38.519 novos casos de cancro. A taxa de incidência total foi de 284,64/100000, sendo no sexo masculino de 342,68/100000 e no sexo feminino de 246,14/100000

Em 2007, foram detetados 170 novos casos de tumores da bexiga, sendo que 56,5% eram tumores uroteliais superficiais, 40,6% uroteliais invasores e apenas 2,9% eram tumores uroteliais (Registo Oncológico, 2007).

Segundo o RORENO do ano de 2007 para 2008, verificou-se um aumento de 6,9% no número de casos registados. O CB ocupa o quinto lugar dos tumores mais frequentes nos homens (572 novos casos) e o décimo nas mulheres (151 novos casos), dos quais 273 são Carcinomas Uroteliais Invasivos, 365 Carcinomas Uroteliais Papilares e 85 Outros Tumores.

Para Portugal, em 2015, estimativas GLOBOCAN 2008 prevêem 2135 novos casos de CB (Tabela 3) e 803 mortes (Tabela 4).

Tabela 3 – Estimativa e previsão da incidência de Cancro da Bexiga em Portugal (Adaptada Globocan 2008).

Ano	Número estimado de novos cancros (todas as idades)	Masculino	Feminino	Ambos os sexos
2008		1479	456	1935
	Idade <65	460	97	557
	Idade >= 65	1019	359	1378
2015		1629	506	2135
	Idade <65	507	103	610
	Idade >= 65	1122	403	1525
	As alterações demográficas	150	50	200
	Idade <65	47	6	53
	Idade >= 65	103	44	147

Previsões demográficas extraídas da *Nações Unidas, World Population Prospects, revisão de 2008*.

Os números são calculados usando taxas de idade específicas e populações correspondentes por 10 grupos de idade.

Tabela 4 – Estimativa e previsão de mortes por Cancro da Bexiga em Portugal (Adaptada Globocan 2008).

Ano	Número estimado de mortes por cancro (todas as idades)	Masculino	Feminino	Ambos os sexos
2008		530	191	721
	Idade <65	73	14	87
	Idade >= 65	457	177	634
2015		588	215	803
	Idade <65	80	14	94
	Idade >= 65	508	201	709
	As alterações demográficas	58	24	82
	Idade <65	7	-	7
	Idade >= 65	51	24	75

Previsões demográficas extraídas da *Nações Unidas, World Population Prospects, revisão de 2008*.

Os números são calculados usando taxas de idade específicas e populações correspondentes por 10 grupos de idade.

1.2 - Fatores de Risco

O CB é uma doença com etiologia multifatorial associada a vários fatores ambientais e genéticos, dos quais o tabagismo é o fator de risco mais importante, responsável por aproximadamente metade dos novos casos em homens e um terço dos novos casos em mulheres. Outros fatores de risco estabelecidos incluem a exposição ocupacional a aminas aromáticas e outros produtos químicos, água potável contaminada com altos níveis de carcinogêneos (por exemplo, o arsênio e subprodutos clorados) (Chen *et alii.*,2009), idade avançada, sexo masculino, caucasianos, infecções da bexiga provocadas por certos parasitas e história familiar ou pessoal de CB (Chou e Dana, 2010). O uso de drogas e consumo de álcool, café e chá também são fatores que podem ser associados com o risco de CB (Chu, Wang e Zhang, 2013).

1.2.1 - Tabagismo

O tabagismo é reconhecido como a principal causa de tumores malignos da bexiga e é responsável por cerca de 50% dos casos em países desenvolvidos (Jankovic e Radosavljevic, 2007; Wu *et alii.*, 2008 e Kakehi *et alii.*, 2010). Os fumadores têm um risco 2 a 5 vezes maior de CB que os não-fumadores e este é diretamente proporcional à quantidade e duração do vício (Ferris *et alii.*, 2013). No entanto, a relação entre fumo passivo e risco de CB permanece discutível (Chu, Wang e Zhang, 2013).

As nitrosaminas, 2 - naftilamina, e 4 - aminobifenilo são conhecidas por estarem presentes no fumo do cigarro e o aumento de metabolitos urinários de triptofano tem sido também detetado nos fumadores de cigarros. O término do hábito de fumar reduz significativamente o risco de CB, no entanto, mesmo depois de 20-25 anos, nunca atinge o nível de risco base de não-fumadores. Outras formas de uso do tabaco são associadas com um risco ligeiramente maior de CB do que a população em geral (Tanaka *et alii.*, 2011).

1.2.2 - Exposição ocupacional

Segundo Letasiová *et alii.* (2012), o fator de risco mais notável para o desenvolvimento de CB é a exposição ocupacional a aminas aromáticas (2-naftilamina, 4-aminobifenilo e

benzidina) e 4,4'-metilenobis (2-cloroanilina). Os compostos de 2-naftilamina, 4-aminobifenilo e benzidina podem ser encontrados nos produtos das indústrias de borracha, poluentes emitidos a partir de produtos químicos, corantes, tintas, tintas para o cabelo, fungicidas, fumo do cigarro, plásticos, metal, fumo dos escapes dos carros e em instalações industriais. A 4,4'-metilenobis (2-cloroanilina) (MBOCA) é um produto químico sintético muito utilizado na indústria, principalmente para a produção de peças de poliuretano moldáveis. A benzidina utilizada na produção de corantes e na indústria da borracha, foi identificada como o carcinogénico mais importante das aminas aromáticas (Letasiová *et alii*, 2012).

1.2.3 – Ambientais

A bexiga humana é um dos principais órgãos alvo para a carcinogénese induzida por arsénico, tendo sido encontrados na urina metabolitos deste suspeito de estarem diretamente envolvidos na carcinogénese (Naranmandura *et alii*, 2011).

O arsénico é um contaminante ambiental natural para os seres humanos que pode ser encontrado diariamente em alimentos, água, ar e solo (Hughes *et alii*, 2011). Estudos anteriores demonstraram que a exposição crónica ao arsénico encontrado na água potável podia ser associada com o desenvolvimento de CB (Kakehi *et alii*, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 200 milhões de pessoas em todo o mundo podem estar cronicamente expostas ao arsénico na água potável em concentrações acima do padrão de segurança de 10 mg / L (OMS 2008) (Naujokas *et alii*, 2013).

1.2.4 - Fármacos

Tem sido demonstrado que a exposição a certas drogas, como a ciclofosfamida utilizada em quimioterapia e o elevado consumo de analgésicos contendo fenacetina, pode causar CB em seres humanos (Jankovic e Radosavljevic, 2007).

1.2.5 - Infecções

Nos países em desenvolvimento, especialmente no Médio Oriente e partes da África, as infecções com os membros do género *Schistosoma* são responsáveis por uma alta incidência de CB, 75 % dos quais são carcinomas de células escamosas (Johanson e Cohen, 1997). Também as pedras do trato urinário podem causar irritação crónica do epitélio da bexiga e aumentar o risco de carcinoma de células escamosas (*Pelucchi et alii, 2006*). As infecções recorrentes em 2 a 10% dos paraplégicos com cateteres de longa permanência também levam ao desenvolvimento de CB, 80% dos quais são carcinomas de células escamosas (*Tanaka et alii, 2011*).

1.2.6 - Genéticos

Familiares de primeiro grau de pacientes com CB têm um aumento do risco relativo de 50-100% de desenvolver a doença, que pode ser ainda maior se este for diagnosticado em idade precoce (*Pelucchi et alii, 2006*). O aumento do risco pode ser devido à suscetibilidade de genes de alta penetrância, num pequeno subconjunto de famílias, mas a maior parte deste risco é provavelmente causado por ADN de baixa penetrância, variantes comuns que influenciam o risco de cancro através de um ou mais percursos diferentes (*Wu et alii, 2008*).

1.2.7 - Outros

O consumo de álcool, de café ou de chá é também apontado como fator de risco no desenvolvimento de CB (*Chu, Wang e Zhang, 2013*).

Nos últimos anos, fatores, incluindo terapia hormonal na menopausa e reprodutiva, dietas ricas em índice glicémico ou carga glicémica, carotenóides e vitamina C são alvo de estudo na investigação do desenvolvimento do CB (*Chu, Wang e Zhang, 2013*).

A idade é um fator de risco para o desenvolvimento de CB, o que ocorre mais comumente em idosos. As idades médias de homens e mulheres que apresentam CB são 72 e 74 anos respetivamente (*Jacobs, Lee e Montie, 2010*).

Apesar da existência de diversos fatores identificáveis que aumentam ou diminuem o risco de CB, muitos pacientes não têm agentes cancerígenos conhecidos ou fatores de risco associados (Cohen, Shirai e Steineck, 2000).

1.3 - Sintomas/ Diagnóstico

1.3.1 - Sintomas

O tipo e a severidade dos sinais clínicos e sintomas do CUB dependem da extensão e localização do tumor, no entanto, a maioria dos pacientes com tumores uroteliais apresenta pelo menos hematúria microscópica. A hematúria indolor, característica do CB, ocorre em 85 % dos pacientes, podendo ocorrer coagulação e provocando micção dolorosa. No caso de grandes tumores, a capacidade da bexiga pode ser reduzida, resultando em micção frequente e pouco abundante. Tumores localizados no colo da bexiga ou cobrindo uma grande área da mesma podem conduzir a sintomas irritativos, isto é, disúria, urgência e frequência em urinar. Sintomas semelhantes podem estar presentes no carcinoma *in situ* (CIS) (Eble *et alii*, 2004).

Os tumores que infiltram o orifício ureteral podem levar a hidronefrose, que é considerada um mau prognóstico. Raramente, os pacientes com doença extensa apresentam massa pélvica palpável ou edema de membros inferiores. Em caso de doença avançada, a perda de peso, dor abdominal ou óssea podem estar presentes devido a metástases (Eble *et alii*, 2004).

1.3.2 - Diagnóstico

O diagnóstico de eleição de CB é o exame cistoscópio da bexiga juntamente com citologia urinária (exame citopatológico do material presente na urina). A cistoscopia é atualmente o exame de referência para o diagnóstico e vigilância de tumores de bexiga (Cariou, Maaraoui e Cortesse, 1997). Esta permite a visualização da mucosa e biópsia das áreas suspeitas para diagnóstico histopatológico e estadiamento (Goodison, Rosser e Urquidi 2013). Este método é invasivo, dispendioso (Tanaka *et alii*, 2011) e desagradável para o paciente, apesar do desenvolvimento de cistoscópios flexíveis (Cariou, Maaraoui e Cortesse, 1997). Como resultado, tem sido colocado ênfase no

desenvolvimento de testes não-invasivos para o rastreio CB. Atualmente, os testes não-invasivos que estão em fase de avaliação ou em utilização na prática clínica como testes de triagem para CB são: citologia urinária, antigénio tumoral da bexiga (BTA), teste de proteína nuclear de matriz (NMP), ensaio do produto de degradação da fibrina (FDP) e teste ácido hialurónico (HA-) hialuronidase (HAase) na urina (Tanaka *et alii*, 2011).

Até ao momento, nenhum marcador ou combinação de marcadores consegue superar a eficiência da cistoscopia ou servir como uma ferramenta de prognóstico confiável (Evelyne, Rosette, Reijke, 2011). A avaliação da doença ainda tem por base parâmetros clínico-patológicos, tais como o tamanho do tumor e aspeto, multifocalidade, presença/ausência de lesões uroteliais planas, tumor residual após ressecção transuretral, e taxa de recorrência. Foram feitas tentativas para substituir cistoscopia por novas modalidades de imagem como a cistoscopia virtual. Esta técnica é baseada na reconstrução digital 3D das imagens da tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) com contraste ou bexiga cheia de ar, que poderá, possivelmente, servir como uma técnica não invasiva para avaliar a mucosa da bexiga (Evelyne, Rosette e Reijke, 2011). A cistoscopia virtual oferece muitas vantagens: permite a localização exata da lesão (devido ao seu campo de visão de 360°), medição do tamanho do tumor e representação de marcos anatómicos fora da bexiga. Pode ser realizada quando a cistoscópica convencional não é adequada, em pacientes com estenose uretral grave ou na presença de hemorragia ativa (Kocakoc *et alii*, 2008). Estudos demonstram que é possível realizar a cistoscopia virtual, mas, atualmente, a sensibilidade não é suficiente para substituir a cistoscopia convencional, devido à incapacidade de deteção de lesões planas ou alterações na cor da mucosa direcionando para uma determinada intervenção terapêutica (Evelyne, Rosette e Reijke, 2011).

O Diagnóstico Fotodinâmico (PDD, também conhecido como cistoscopia de fluorescência) é uma técnica que aumenta a sensibilidade na identificação de CB. O PDD, aumenta o contraste visual entre tecido benigno e maligno, através da indução de um processo fotodinâmico, o que resulta na emissão de fluorescência seletiva a partir das células cancerosas. Embora esta técnica seja recomendada pelas diretrizes de 2006

da Associação de Urologia Europeia (EAU) para a detecção de CIS, esta não foi ainda introduzida na rotina urológica (Jichlinski e Jacqmin, 2008).

O exame citopatológico de urina ou outras amostras citológicas do trato urinário é um procedimento não-invasivo de rotina no diagnóstico de CB, especialmente em pacientes com hematúria indolor. É também usado no controlo dos pacientes previamente tratados de CB, com o objetivo de detetar precocemente recidivas ou tumores primários. Este é um método altamente específico no diagnóstico de tumores invasivos, CIS e carcinoma papilar de alto grau, no entanto, é pouco fiável para a detecção de tumores papilares de baixo grau (Flezar, 2010).

A ressecção transuretral da bexiga (RTUB) é o passo inicial e crítico na gestão de tumores da bexiga. O objetivo do processo é a remoção completa de tumores papilares superficiais não invasores, para estabelecer o diagnóstico histológico e determinar o grau e estágio do tumor. Embora a RTUB seja um procedimento realizado com frequência, os seus resultados são limitados pela alta taxa de recorrência e pelo risco de subestadiamento do tumor (Babjuk, 2009). A avaliação inicial deve incluir uma ressecção transuretral completa com músculo detrusor subjacente. O estágio e o grau histopatológico serão atribuídos se a lâmina própria ou o músculo detrusor estiverem envolvidos (Leung, Griffiths e Neal, 1996).

Uma segunda ressecção é recomendada em pacientes com Ta e T1 de alto grau, numa tentativa de evitar o subestadiamento e a progressão para doença metastática (Jacobs, Lee e Montie, 2010).

A TC da pelve e abdómen é realizada em pacientes com tumores invasivos, para definir grau de invasão, linfomegalia local e avaliar a possível ressecabilidade (Leung, Griffiths e Neal, 1996).

Apesar da introdução de novas modalidades, o padrão atual para o diagnóstico inicial, bem como acompanhamento, continua a ser a visualização direta da mucosa da bexiga por cistoscopia (Evelyne, Rosette e Reijke, 2011), biópsia e citologia de urina. Até à

data, marcadores moleculares urinários não melhoraram a combinação de cistoscopia e citologia (Babjuk *et alii*. 2013).

1.4 - Classificação histológica dos tumores da bexiga

A bexiga é um órgão oco, cuja parede compreende (do exterior para o interior) serosa, muscularis, submucosa, muscularis mucosa e lâmina própria. A camada de células epiteliais que cobre a lâmina própria e reveste o seu interior é o urotélio - epitélio de transição (Lewis, 2000), que se estende desde a pelve renal até à uretra (Birder, 2005). O urotélio é composto por diferentes tipos de células: células em “guarda-chuva” que revestem o lúmen da bexiga, células intermediárias e células basais, que são adjacentes à lâmina própria (Puzio-Kuter *et alii*, 2009). (Figura 1)

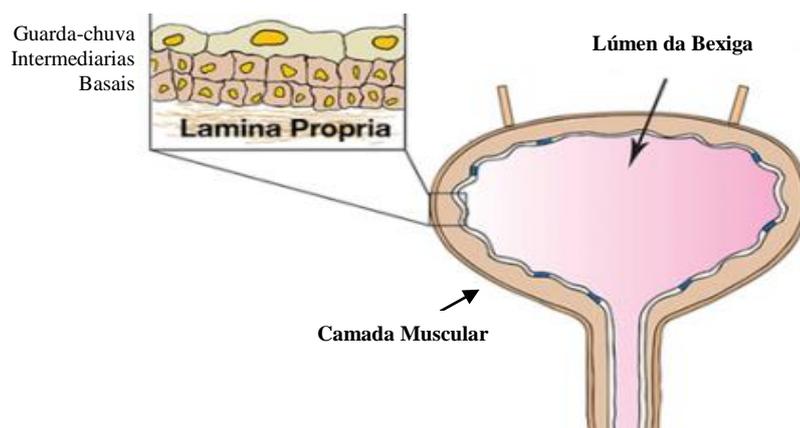


Fig. 1 – Epitélio da bexiga (adaptada (Puzio-Kuter, *et alii*. 2009)).

Cerca de 90 % dos tumores da bexiga diagnosticados derivam do epitélio urotelial, ou seja CUBs (Puzio-Kuter *et alii*, 2009). O carcinoma de células escamosas constitui cerca de 6% a 8 % dos tumores da bexiga e está associado a infeções persistentes ou a irritação crónica do epitélio. Os adenocarcinomas representam cerca de 2% das neoplasias da bexiga (Vishnu, Mathew e Tan, 2011).

Cerca de 70-80% dos CUBs são carcinomas papilares de baixo grau, superficiais, ou seja, não invasores da camada muscular, enquanto os restantes (20-30%) são carcinomas invasores. O carcinoma não invasor está associado a uma maior sobrevivência em relação a outras doenças malignas, mas 30-50 % dos pacientes acabará por ter recorrência após a ressecção transuretral (RTU) do tumor primário e 10-20% irão progredir para tumor invasor da bexiga (Jin *et alii*, 2014). As três categorias gerais de CUB - superficial, invasor e metastático – diferem na sua biologia, fenótipo, prognóstico e terapêutica. O CB superficial inclui o Ta, o CIS e o T1. O CUB invasor é um tumor epitelial agressivo com uma alta taxa de disseminação sistêmica precoce e uma baixa taxa de sobrevivência a longo prazo. Cerca de 50% desses pacientes desenvolve metástases e, por último, sucumbem à doença. Habitualmente este metastiza para os nódulos linfáticos regionais (78 %), fígado (38 %), pulmão (36 %), osso (27 %), glândula supra-renal (21 %) e intestino (13%) (Vishnu, Mathew e Tan, 2011). (Figura 2)

Os tumores superficiais, que representam a grande maioria (75% a 85%), têm um prognóstico favorável, enquanto que a sobrevida em 5 anos para pacientes com tumor invasor da bexiga (25% do total dos tumores da bexiga) pode ser menor do que 10% (Puzio-Kuter *et alii*, 2009).

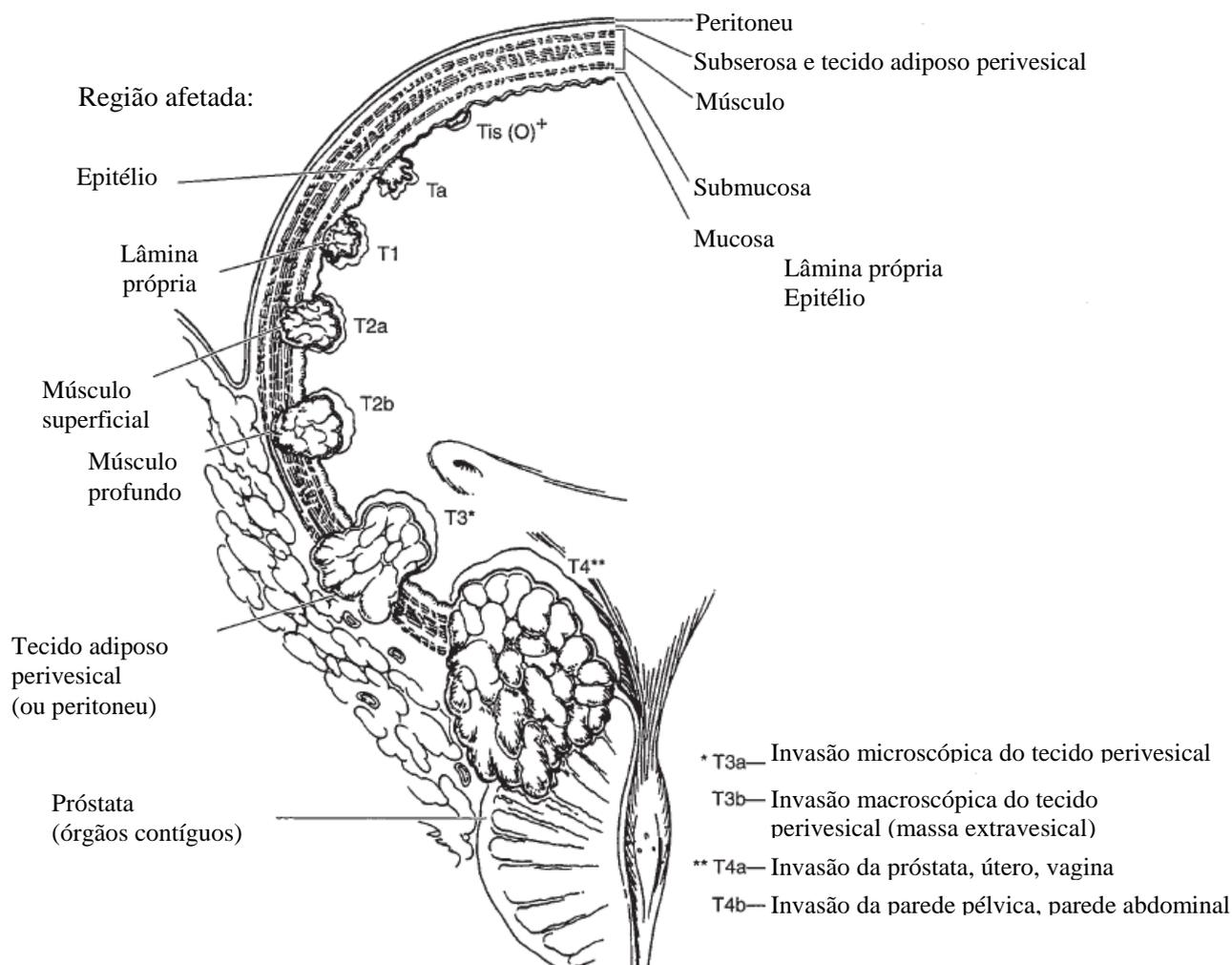


Fig. 2 – Ilustração da extensão da invasão tumoral (Adaptada - *Repositorio.hff.min-saude.pt* - Tumor da Bexiga. Visão do urologista. Bruno Graça).

Existem diferentes classificações de tumores da bexiga, com base nos achados clínicos ou nos padrões histológicos do tumor ou em ambos (Deeley e Desmet, 1963). Desde 1967 que se utiliza o sistema TNM (Tumor, Nódulo, Metástase) da UICC (União Internacional Contra o Cancro) para a classificação dos tumores de bexiga (Tabela 5) (Vogler, Rothkopf e Mebel, 1975). A classificação histológica de tumores da bexiga, da OMS, foi formulada para promover uma melhor comunicação internacional e comparações estatísticas mais confiáveis. O tipo histológico, grau de anaplasia e crescimento padrão são as bases da classificação (Sobin, 1978). (Tabela 6)

Tabela 5 – Classificação do carcinoma vesical TNM de 2009 (Adaptada de Babjuk *et alii.* 2014, Witjes *et alii.* 2014).

Classificação TNM de 2009	
T – Tumor primário	
TX	Tumor primário não avaliável
T0	Sem evidência do tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (“tumor plano”)
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor que invade o músculo
T2a	Tumor que invade a camada muscular superficial (metade interna)
T2b	Tumor que invade a camada muscular profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido perivesical
T3a	Microscopicamente
T3b	Macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal
T4a	Tumor que invade a próstata, útero ou vagina
T4b	Tumor que invade a parede pélvica ou parede abdominal
N – Gânglios Linfáticos	
NX	Gânglios linfáticos não avaliáveis
N0	Sem metástases nos gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases num único gânglio linfático na pélvis (hipogástrica, obturador, ilíaca externa ou pré-sagrada)
N3	Metástases nos gânglios linfático na ilíaca comum
M – Metástases distantes	
MX	Metástases não avaliáveis
M0	Sem metástases distantes
M1	Metástases distantes

Tabela 6 – Classificação da OMS de 1973 e 2004 (Adaptada de Babjuk *et alii.* 2014, Witjes *et alii.* 2014).

Classificação da OMS de 1973 e 2004

(Usam-se ambas as classificações no presente texto uma vez que a maioria dos estudos retrospectivos são baseados no antigo sistema de classificação da OMS de 1973)

Classificação da OMS de 1973

Além da sua arquitetura, as células individuais apresentam diferentes graus de anaplasia:

Papiloma urotelial

Grau 1: Tumor bem diferenciado

Grau 2: Tumor moderadamente diferenciado

Grau 3: Tumor pouco diferenciado

Classificação da OMS de 2004

Lesões planas

Hiperplasia (lesão plana ou papilar sem atipia)

Atipia reativa (lesão plana com atipia)

Atipia de significado determinado

Displasia urotelial

Carcinoma urotelial *in situ* (cis)

Lesões papilares

Papiloma urotelial (lesão benigna)

Neoplasia papilar urotelial de baixo potencial maligno

Carcinoma urotelial papilar de baixo grau

Carcinoma urotelial papilar de alto grau.

1.5 – Tratamentos

Cada estado clínico do CB está associado com a biologia do tumor original, prognóstico e abordagem ao tratamento. O objetivo do tratamento em cada estado é prevenir ou retardar a progressão para estados de doença mais avançados ou morte, mantendo a qualidade de vida (Galsky e Hall, 2010). A cirurgia, a quimioterapia, a imunoterapia e a radioterapia são as opções de tratamentos para CB (National Cancer Institute-NCI).

A terapêutica habitual para os tumores papilares Ta e T1 da bexiga é a erradicação macroscópica completa por RTU, incluindo parte do músculo subjacente (Babjuk *et alii*, 2009). A segunda RTU é recomendada 2-6 semanas após a ressecção inicial, nas seguintes situações: RTU inicial incompleto por ausência de músculo na amostra (com exceção dos tumores TaG1 e CIS primários), em todos os tumores T1 e em todos os tumores G3 (exceto CIS primário) (Babjuk *et alii*, 2013). Uma vez que existe um risco considerável de recorrência e/ou progressão dos tumores após RTU, é recomendada terapêutica adjuvante intravesical para todos os estádios (Ta, T1e CIS). Todos os doentes devem receber uma instilação de quimioterapia intravesical no pós-operatório imediato, no espaço de 6 horas após a RTU; a escolha do fármaco (mitomicina C, epirrubicina ou doxorubicina) é opcional. A aplicação da terapêutica adjuvante intravesical adicional depende do risco de recorrência e/ou progressão (Babjuk *et alii*, 2009).

A quimioterapia intravesical reduz o risco de recorrências mas não a progressão e está associada a efeitos secundários. A imunoterapia intravesical com BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) é superior à quimioterapia intravesical na redução de recorrências e na prevenção ou atraso da progressão para carcinoma invasor (Babjuk *et alii*, 2009). O BCG é uma vacina viva mas atenuada de uma estirpe de tuberculose bovina, inicialmente utilizada como vacina contra a tuberculose. Atualmente é um dos agentes mais eficazes para o tratamento do CB, em particular do CIS (Grupo Português Genito Urinário 2011). No entanto, o BCG intravesical é mais tóxico (Babjuk *et alii*, 2009).

Na tabela abaixo podemos observar a terapêutica recomendada de acordo com o tumor diagnosticado.

Tabela 7 – Recomendações de tratamento em tumores TaT1 de acordo com a estratificação de risco (Adaptada de Babjuk *et alii.* 2013).

Tipo de Risco	Definição	Tratamento Recomendado
Tumores de baixo	Primário, único, Ta, G1, <3cm, sem CIS	Uma instilação imediata de quimioterapia
Tumores de risco intermédio	Todos os casos entre o baixo e alto risco	Uma instilação imediata de quimioterapia seguida de terapêutica de manutenção durante 1 ano ou 1 ano de imunoterapia BCG
Tumores de alto risco	Tumores T1 Tumores G3 CIS Múltiplos, recorrentes e grandes (>3cm) tumores Ta G1G2 (devem estar presentes todas estas condições)	Instilação intravesical de BCG, dose completa, durante 1-3 anos ou cistectomia radical (em tumores de risco mais elevado)
Subgrupo de tumores de risco mais elevado	T1G3 associado com CIS da bexiga, múltiplo e/ou grande T1G3 e/ou recorrente T1G3, CIS com T1G3 na uretra prostática, variante micropapilar do carcinoma urotelial	Cistectomia radical deve ser considerada
	Tumores BCG refratários	Cistectomia radical é recomendada

O tratamento padrão para pacientes com CUB invasivo é cistectomia radical (Witjes *et alii*, 2014), que exige a remoção da bexiga, órgãos adjacentes e gânglios regionais (Vishnu, Mathew e Tan, 2011). No entanto, a sobrevida a 5 anos é de apenas 50% dos pacientes (Witjes *et alii*, 2014). Apesar de ser uma cirurgia curativa, cerca de metade desses pacientes desenvolvem a doença metastática no prazo de 2 anos, com uma elevada taxa de mortalidade. A administração de quimioterapia neoadjuvante e adjuvante sistêmica baseada em cisplatina poderá, aumentar a probabilidade de erradicar a doença micrometastática e assim, melhorar a sobrevivência neste grupo de pacientes. A quimioterapia neoadjuvante seguida por cistectomia radical é hoje considerada por muitos como o novo padrão de tratamento para esta doença (Vishnu, Mathew e Tan, 2011). Apesar de estudos em grande escala, randomizados, de fase III e evidenciando os benefícios da sua utilização, a quimioterapia neoadjuvante ainda é pouco usada. (Witjes *et alii*, 2014).

Os tumores invasores e metastáticos representam a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com CUB e os protocolos terapêuticos atualmente disponíveis são ineficazes em fornecer uma resposta efetiva ou resultados positivos. Novas estratégias e novos agentes terapêuticos devem ser testados (Nóbrega *et alii*, 2013).

1.6 - mTOR

Nos últimos anos, as descobertas no campo da transdução de sinal levaram à identificação de moléculas-chave envolvidas nas vias que regulam a sobrevivência celular, apoptose, proliferação e processos associados a tumores, tais como angiogênese e metastização. Uma molécula de sinalização recentemente estudada para terapêutica e que desempenha um papel crítico na oncogênese é o mTOR (Mansure *et alii*, 2009). Como referido anteriormente o mTOR é uma proteína serina/treonina cinase de 239 kDa (Ching e Hansel, 2010; Laplante e Sabatini, 2009) a jusante da via PI3K/AKT, (Mansure *et alii*, 2009; Gust e So, 2009).

O mTOR é um componente essencial de dois complexos multiproteicos mTORC1 e mTORC2 (figura 3). O complexo sensível à rapamicina mTORC1 é composto por

mTOR (proteína cinase heterotrimétrica), LST8 (também conhecida por GβL), “Raptor” (proteína reguladora associada ao mTOR) e AKTS1 (também conhecida por Pkb). O mTORC2 é composto por mTOR, LST8, Rictor (não sensível a rapamicina) e mSIN1 (proteína cinase ativada por mitogêneos (MAPK) associada a proteína1) (Gust e So, 2009; Ching e Hansel, 2010).

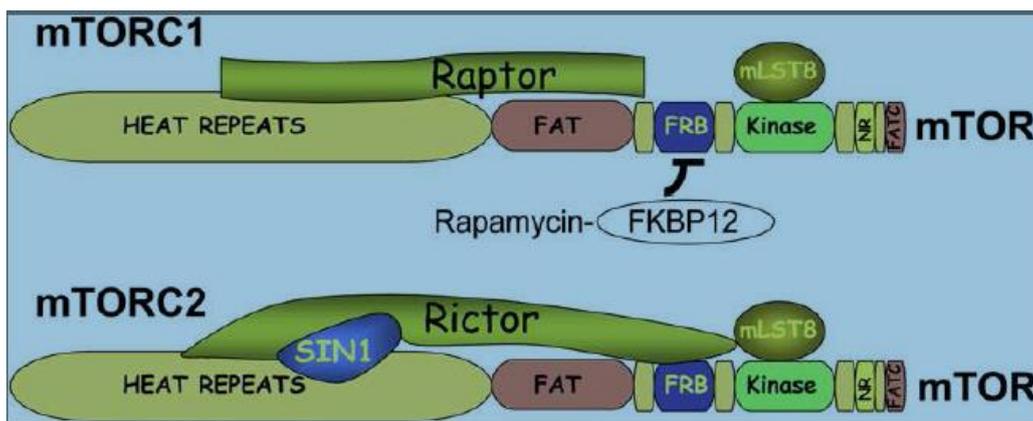


Fig. 3 – Composição dos complexos mTOR (adaptada (Bhaskar e Hay, 2007)).

O mTORC1 e 2 são ativados de diferentes formas e têm especificidade de substrato diferente. O mTORC1 responde a energia, aminoácidos, fatores de crescimento e níveis de oxigênio, enquanto a ativação mTORC2 não está bem esclarecida, mas parece ser mediada apenas por fatores de crescimento. O mTORC1 fosforila o S6K1 e 4EBP1 que são proteínas envolvidas na regulação da iniciação da tradução, síntese de proteínas e proliferação celular (Efeyan e Sabatini, 2010) e o mTORC2 regula a remodelação do citoesqueleto, dependente da actina (Ching e Hansel, 2010).

1.6.1 - Via de sinalização mTOR

O mTOR é apenas uma parte da via PI3K/Akt/mTOR (figura 4) (Ching e Hansel, 2010). A via PI3K/AKT/mTOR integra sinais de diferentes origens, como fatores de crescimento, hormonas, nutrientes, níveis de oxigênio e está associada a outras vias (Gust e So, 2009).

A ativação começa quando fatores de crescimento (insulina e IGFs), mitógenos, hormonas ou nutrientes ativam PI3K (Ching e Hansel, 2010); esta converte fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (Gust e So, 2009) que, por sua vez, se liga à proteína cinase B (Akt 1) (Chen *et alii*, 2009) e recruta PDK1 (proteína-cinase dependente 1) para a membrana celular onde se liga e fosforila o Akt1. Este é considerado o nó de sinalização mais crítico nesta via regulando diversos substratos, que afetam processos envolvidos no controlo do crescimento e sobrevivência celular (Nawroth *et alii*, 2011). O Akt1 ativado, por sua vez, inativa o complexo esclerose tuberosa (TSC), composto por TSC1 e TSC2, por fosforilação direta da proteína GTPase ativadora TSC2. TSC2 e TSC1 normalmente atuam como proteínas supressoras tumorais inibindo o crescimento celular, uma vez que regulam negativamente a proteína GTPase ativando a Rheb (homóloga da proteína RAS enriquecida no cérebro). Uma vez libertado da inibição TSC, o Rheb ativa o mTORC1 (Ching e Hansel, 2010).

O mTOR ativado, subsequentemente, fosforila a proteína p70 S6 cinase-1 (S6K p70) e 4E-BP. A primeira fosforila a proteína ribossômica S6 da subunidade 40S, aumentando a tradução do RNAm; por outro lado, também se liga às membranas mitocondriais inativando a molécula pró-apoptótica BAD. A fosforilação de 4E-BP dá início ao processo de tradução com a consequente formação de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular após a fase G1, tal como a ciclina D1 (Ching e Hansel, 2010).

Os aminoácidos ativam mTORC1 por uma via independente mediada pela família de proteínas Rag (Efeyan e Sabatini, 2010). A GTPases Rag interage com mTORC1, o que promove a sua translocação desde o citoplasma para as membranas lisossomais, local onde possivelmente se encontra Rheb (Laplante e Sabatini, 2012). A ativação do mTORC2 não está bem esclarecida, mas este complexo ativa diretamente Akt por fosforilação. Além disso, Akt regula muitas proteínas envolvidas na sobrevivência celular e na progressão do ciclo celular (Efeyan e Sabatini, 2010).

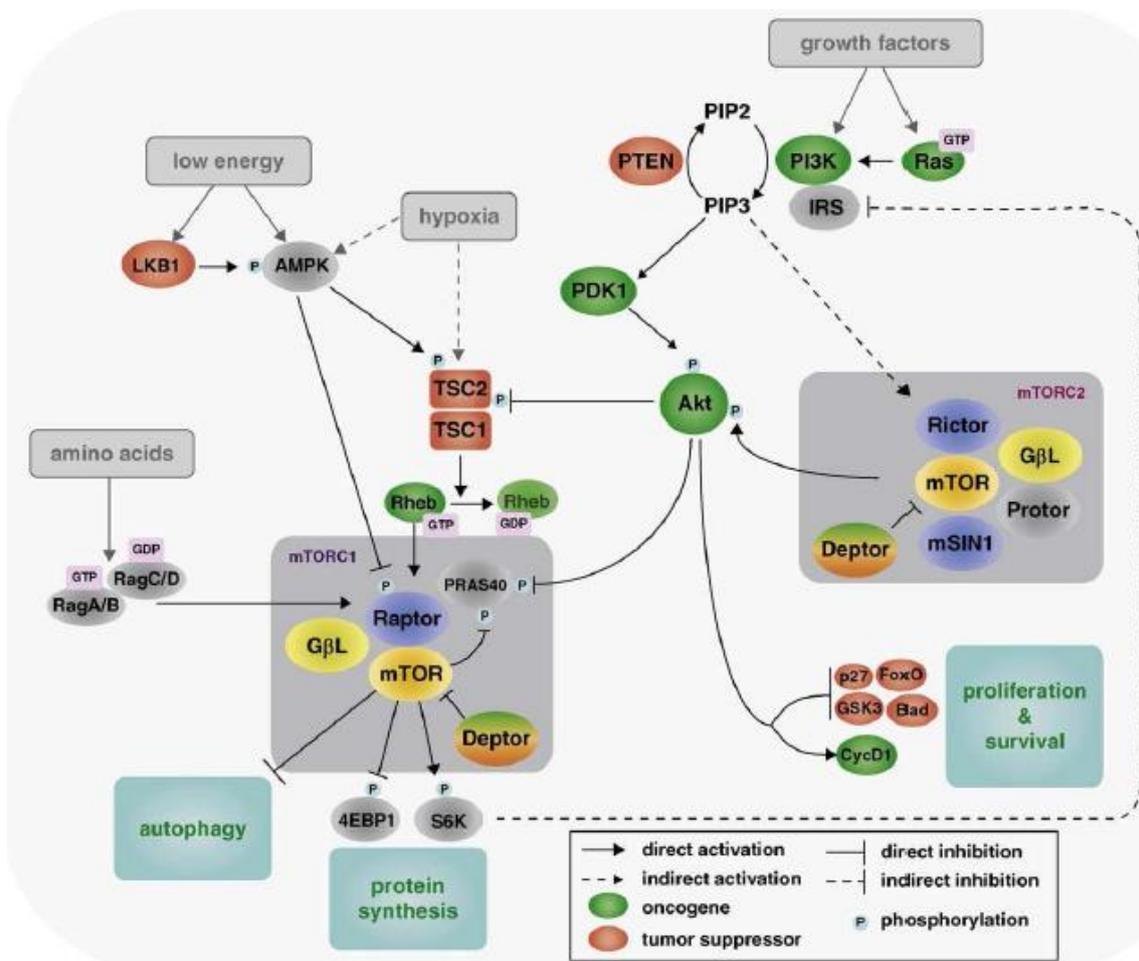


Fig. 4 – Via de sinalização do mTOR (adaptada (Efeyan e Sabatini 2010)).

1.6.2 - Sinalização a montante do mTOR

1.6.2.1 - PI3K/AKT

A PI3K é um heterodímero que consiste numa subunidade catalisadora (p110) e uma subunidade reguladora (p85, p55, p50). A subunidade catalítica p110 ativada, codificada pelo gene PIK3CA, fosforila fosfatidilinositol bifosfato 4-5 no folheto interno da membrana citoplasmática para gerar PIP3 (Ching e Hansel, 2010). Esta reação pode ser invertida pela PTEN (gene supressor tumoral homólogo da fosfatase e tensina) que atua como inibidor da via PI3K pela desfosforilação de PIP3 em PIP2 (Gust e So, 2009).

A PI3K é um mediador fundamental do crescimento celular. Na verdade, a cinética de atuação do PI3K estimula vias de sinalização de fatores de crescimento como S6K.

Por um lado, a subunidade p85 do PI3K/mTOR é necessária para a ativação do S6K, mas, por outro lado, a PI3K pode regular a ativação da mesma por outra via - PDK1 (Proteína 3-fosfoinositida dependente cinase).

O PI3K na sua forma ativa neutraliza a ação do complexo TSC (Carrera, 2004).

1.6.2.2 - PTEN

A PTEN é uma fosfatase multifuncional, encontrada não só na membrana celular e no citoplasma mas também no núcleo, onde se acredita que exerce funções de supressor tumoral. Alterações na PTEN encontram-se em alguns tipos de cancro tais como glioblastoma, próstata, endométrio, melanoma, mama e bexiga. A PTEN atua na regulação da quimiotaxia e migração celular, estes mecanismos podem promover a invasão tumoral.

No citoplasma, PTEN usa a sua atividade de fosfatase lipídica para regular os processos de sinalização celular através da via PI3K/AKT/mTOR, desempenhando um papel importante na apoptose e crescimento celular. Especificamente, PTEN desfosforila PIP3, impedindo a ativação Akt1 (Ching e Hansel, 2010; Knowles *et alii*, 2009). Em contraste, no núcleo, a PTEN regula o ciclo celular e a sua progressão mantendo a estabilidade cromossômica independentemente do AKT.

Estas diferenças de localização no PTEN poderão ser importantes na progressão tumoral, uma vez que a sua expressão varia entre tecidos normais e tecidos oncológicos (Ching e Hansel, 2010).

1.6.2.3 - AKT1

A Akt é um efetor a jusante de PI3K. Akt é ativada por sinais extracelulares que por sua vez induzem PI3K a gerar PIP3. A atividade da Akt é regulada negativamente pela desfosforilação de PIP3 por fosfatases fosfolípídicas tal como o PTEN (Bhaskar e Hay, 2007).

1.6.2.4 - TSC

Um dos fatores mais importantes envolvidos na regulação da atividade mTORC1 é o TSC, que é um heterodímero que compreende TSC1 (também conhecido como hamartina) e TSC2 (também conhecido como tuberina). O complexo TSC1 / 2, como já foi referido anteriormente, regula negativamente a proteína GTPase (GAP) ativando o Rheb. O Rheb, por sua vez, quando libertado, pode ativar mTORC1. (Laplante e Sabatini, 2009).

O TSC1 é um dos dois genes que, quando mutado na linha germinativa, causa o síndrome esclerose tuberosa, um síndrome autossômico dominante, caracterizado pelo desenvolvimento de hamartomas nos rins, coração, cérebro e pele (Knowles *et alii*, 2009).

1.6.3 - Sinalização a jusante do mTOR

O mTORC1 controla positivamente a síntese proteica, que é necessária para o crescimento celular, através de vários efetores a jusante (Laplante e Sabatini, 2009). Os substratos mais conhecidos de mTORC1 são as cinases p70S6K1 (S6K1) e a eIF4E proteína de ligação 1 (4EBP1), ambas importantes no controlo da iniciação da tradução proteica.

S6K1 pode ser ativada por vias dependentes e independentes do mTOR, tais como PDK1, MAPK e SAPK (proteína cinase induzida por stress). Apesar disso, a fosforilação do S6K1 pode ser bloqueada por inibidores do mTOR. O S6K1 está envolvido na tradução de proteínas ribossomais, fatores de alongamento e IGF2 (Pópulo, Lopes e Soares, 2012; Nawroth *et alii*, 2011).

O 4EBP1 inibe a tradução proteica ligando-se e inativando o eIF4E. O mTORC1 fosforila o 4EBP1 provocando a dissociação destas proteínas. O eIF4E na sua forma livre induz a tradução do RNAm levando à transição no ciclo celular da fase G1 para S (Hay, 2005).

1.6.4 - Via mTOR no Cancro

As vias de sinalização celular têm um papel crítico na tumorigénese, alterações no gene ou nas proteínas subjacentes a estas vias podem influenciar o controlo do ciclo celular, reparação do ADN e o metabolismo carcinogénico (Ching e Hansel, 2010); como tal, cada vez mais, a atenção está voltada para investigar a patogénese molecular do CUB, e assim elucidar as vias envolvidas no desenvolvimento e progressão da doença, em particular, a via mTOR (Ching e Hansel, 2010; Makhlin *et alii*, 2011)

Alterações na via mTOR são comuns em numerosas neoplasias malignas (Ching e Hansel, 2010) e benignas. A ativação aberrante da via através da estimulação ou perda de oncogenes e genes supressores tumorais contribui para o crescimento do tumor, angiogénese e metastização. Mutações no gene do mTOR, que conferem ativação constitutiva da sinalização do mTOR, mesmo sob condições de carência de nutrientes, têm sido identificadas em alguns cancros humanos. Na Tabela 8 encontram-se resumidos os componentes de sinalização a montante e a jusante de mTORC1, frequentemente alterados em tumores (Pópulo, Lopes e soares, 2012).

Tabela 8 – Os proto-oncogenes e genes supressores de tumor ligados ao mTOR (Adaptada (Pópulo, Lopes e Soares, 2012)).

Proto-oncogene	Descrição das alterações
AKT	AKT é amplificada num subconjunto de cancros humanos, tais como, cancro da mama e ovário.
4EBP1	4EBP1 a sua expressão está associada como fator de pior prognóstico em vários cancros humanos, como mama, cólon, ovário e próstata. A fosforilação de 4EBP1 foi encontrada em tumores do ovário quimioresistentes.
eIF4E	Sobre-expressão ectópica de eIF4E pode transformar células <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> . O eIF4E é sobre-expresso em muitos tumores humanos, tais como, cancro de mama, cólon e cabeça e pescoço, linfomas não-Hodgkin e leucemia mieloide crónica e aguda.
PI3K	Elevada atividade de PI3K está implicada na transformação celular e progressão do tumor, descritos em vários cancros humanos, tais como, cancro do ovário, gastrointestinais, mama e próstata.
Rheb	Sobre-expressão de Rheb é descrita em muitas células tumorais, a sua regulação positiva é crítica para o carcinoma espinocelular e está associada com mau prognóstico no cancro de mama, cabeça e pescoço.
S6K1	S6K1 está sobre-expressa no cancro do pulmão e ovário e a sua expressão correlaciona-se com mau prognóstico na mama, rim e carcinoma hepatocelular.
Genes supressores de tumor	
LBK1	Indivíduos com mutações em LKB1 desenvolvem síndrome Peutz-Jeghers, que inclui a ocorrência de hamartomas no trato gastrointestinal.
PTEN	A perda da função de PTEN foi descrita em grande parte dos cancros humanos avançados, como cancro da mama, próstata, rim e melanoma. Indivíduos com mutações hereditárias em PTEN desenvolvem síndromes tumorais (doença Cowden, síndrome de Bannayan-Ruvacaba-Riley, síndrome de Proteus, doença de Lhermitte-Duclos) e estão em maior risco de desenvolver vários tipos de cancro.
TSC1/TSC2	Os pacientes com mutações em TSC1 ou TSC2 desenvolvem complexo esclerose tuberosa (TSC), uma síndrome que inclui o desenvolvimento de hamartomas em diversos órgãos. Mutações em TSC2 podem também levar ao desenvolvimento de Linfangioleiomiomatose (LAM).

1.6.5 - Via de sinalização mTOR no CUB

Como está descrito as alterações observadas no CUB podem surgir através de duas vias divergentes. A primeira via é caracterizada por mutações de ganho de função em oncogenes como o H-ras, recetor de fatores de crescimento fibroblasto (FGFR) e com menos frequência PI3K - esta dá origem a tumores papilares superficiais, que frequentemente recorrem, mas raramente são fatais. A segunda via envolve a inativação, geralmente por via da perda de funções por mutações em genes supressores tumorais, por exemplo p53, PTEN e retinoblastoma (RB1) - esta leva à formação de tumores invasores e metastáticos (Korkolopoulou *et alii*, 2012; Schultz *et alii*, 2010). Melhorias na compreensão da oncogénese do CUB têm alimentado a atual busca de marcadores biológicos que podem ser direcionados para a terapia ou prognóstico (Schultz *et alii*, 2010).

A desregulação da via PI3K/Akt/mTOR tem sido implicada no desenvolvimento de carcinoma urotelial (Sun, Chang e Pan, 2011). As alterações moleculares dos efetores da via PI3K/AKT foram relatadas no CUB, incluindo deleções da PTEN (24-58% de CUB invasor T2-T3-T4), mutações inativadoras do TSC1 (10-15% dos CUB), mutações ativadoras de PIK3CA, o gene que codifica a subunidade catalítica de PI3K (20% tumores baixo grau) e AKT (4,8% de CUB). Estudos imunohistoquímicos relataram uma diminuição na expressão de PTEN em cerca de 50% do CUB, e um aumento na expressão da pAKT em cerca de 88% dos casos (Calderaro *et alii*, 2014).

A sobreativação da via mTOR promove o comportamento mais agressivo da doença em vários tipos de cancro; a atividade do mTOR foi associada com a redução da sobrevivência dos pacientes com CUB e aumento do estágio de progressão tumoral (Ching e Hansel, 2010).

Em 2011, Sun e colaboradores verificaram que no conjunto de pacientes com mau prognóstico e baixa taxa de sobrevivência, a longo prazo, um pequeno subconjunto com uma taxa de sobrevivência ainda pior, mostrou uma expressão elevada de p-mTOR e p-Akt, indicando que o mTOR ativo e a Akt promovem a doença mais agressiva (Sun, Chang e Pan, 2011). Esta conclusão é corroborada pelo estudo de Hansel e

colaboradores que demonstraram, que o p-mTOR ativo reduz a sobrevivência em pacientes com CUB músculo-invasor (Hansel *et alii*, 2010)

No que respeita à proteína S6, a jusante do mTOR, estudos *in vitro* demonstraram uma relação diretamente proporcional de S6 e proliferação tumoral, nomeadamente, apontaram a expressão aumentada de S6 em CUB invasivo da camada muscular (Hansel *et alii*, 2010).

Park e colaboradores encontraram igualmente uma expressão elevada de p-S6 relacionada com tumores de alto grau e de estádios avançados, no entanto a expressão do mTOR por si só não estava aumentada (Park *et alii*, 2011). Em concordância com este trabalho outros estudos demonstraram que a expressão elevada da p-S6 e pAKT eram preditivos da mortalidade em casos de CUB não invasores da camada muscular (Sun, Chang e Pan, 2011).

Em 2013, Fahmy e colaboradores demonstraram em amostras de pacientes com CUB não invasores da camada muscular que a expressão de S6K se relacionava com uma maior probabilidade de recorrência do carcinoma (Fahmy *et alii*, 2013).

Em oposição outros estudos demonstram que não só a menor expressão de S6K como também a de 4eBP1 se relacionava com a maior recorrência do CUB nomeadamente T1 (Chaux *et alii*, 2013).

1.6.6 - Inibidores do mTOR

A rapamicina, um inibidor específico do mTOR, é um antibiótico natural descoberto há 20 anos, com ação anti-proliferativa e efeitos imunossupressores (Gust e So, 2009); esta não afeta diretamente a atividade catalítica do mTOR mas, em vez disso, interrompe a formação do complexo proteína mTOR (mTORC), bloqueando assim a sinalização mTOR. (Hoeffler e Klann, 2010). (Figura 5)

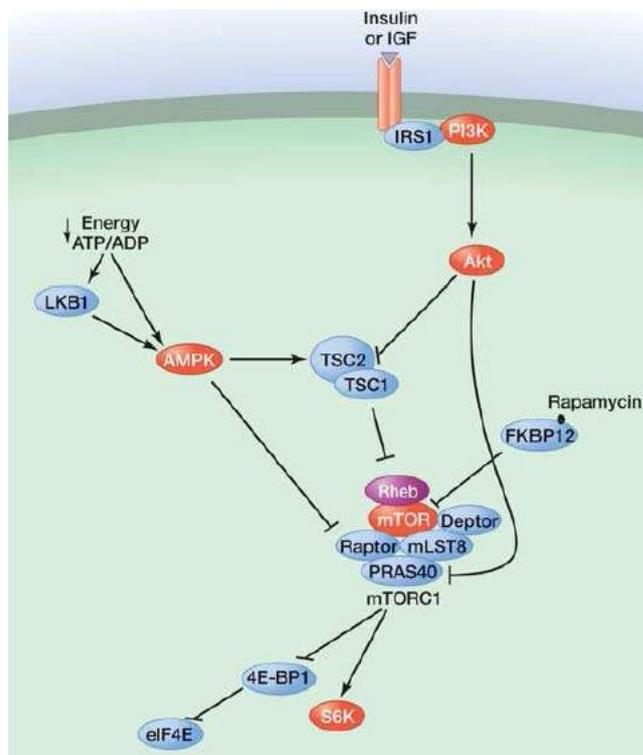


Fig. 5 – Via de sinalização mTOR simplificada e a atuação da rapamicina (adaptada (Laplante e Sabatini 2012)).

O mTORC1 é sensível à rapamicina concorrendo entre Raptor e FKBP12-RAP pela ligação ao domínio FRB. O FRB é um local de regulação positiva, ainda que por meios indiretos. O Rheb estimula a função mTORC1, através do bloqueio da inibição de ligação de FKBP38 pelo FRB. O FKBP38 está intimamente relacionado com FKBP12, recetor intracelular da rapamicina. FKBP38 é formado a partir de um domínio do FKBP-C (a sequência consenso mínima FKBP12) e um par de domínios de interação proteína-proteína. FKBP38 por ligação à Rheb-GTP liberta o mTORC1 FRB disponibilizando-o para Raptor (Hoeffler e Klann, 2010).

O mTORC2 contém Rictor, como o nome indica resistente à rapamicina. Apesar disso, o mTORC2 é afetado pela prolongada exposição à rapamicina. Além disso, o recém-sintetizado Rictor é susceptível à rapamicina, sugerindo que apenas o mTORC2 pré-formado é resistente à mesma, talvez bloqueando o acesso ao FRB (Hoeffler e Klann, 2010).

Inibidores do mTOR têm predominantemente efeitos citostáticos e, em ensaios clínicos, estes agentes parecem estabilizar a doença, embora tenham capacidade limitada para induzir a regressão significativa dos tumores (Gust e So, 2009). Curiosamente, a inibição do mTOR tem sido usada para sensibilizar certas células cancerosas à terapia com cisplatina (Makhlín *et alii*, 2009). Esta inibição seletiva pode ser conseguida usando rapamicina ou análogos (rapalogs) (Hansel *et alii*, 2010), temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD 001) e deforolimus ou A23573. Estes compostos usam o mesmo mecanismo que a rapamicina e são considerados potentes agentes antitumorais. A principal diferença entre estes compostos é a sua biodisponibilidade e o facto de que o temsirolimus e o deforolimus, sendo solúveis em água, podem ser administrados por via intravenosa, enquanto que a rapamicina e o everolimus têm baixa solubilidade e devem ser administrados por via oral. Os rapalogs (Ching e Hansel, 2010) estão atualmente em uso em numerosos ensaios clínicos de tumores sólidos, com resultados promissores em pacientes com carcinoma avançado de células renais (Hansel *et alii*, 2010). Como resultado, futuros estudos destas vias no CUB são de todo o interesse, dado o seu potencial de informação prognóstica e terapêutica direcionada (Ching e Hansel, 2010).

Recentemente, foram já desenvolvidos três inibidores químicos distintos do S6, um dos quais uma proteína quimérica e testados em linhas celulares humanas de CB (Couty *et alii*, 2013).

Neste último ano surgiram igualmente inibidores duplos da PI3K/mTOR acompanhados de estudos em linhas celulares tumorais de bexiga resistentes à cisplatina-NVP-BEZ235 (Moon *et alii*, 2014).

Sendo assim, é necessário desenvolver biomarcadores que ajudem a prever a mTOR-inibição-sensibilidade/resistência de modo a selecionar melhor os tumores que beneficiem do tratamento com inibidores do mTOR (Gust e So, 2009).

Como referido anteriormente, é consensual que alterações na via PI3K/AKT/mTOR relacionam-se com a progressão tumoral e sobrevivência dos pacientes com CUB. No entanto são, ainda, escassos estudos em *in vivo* e *in vitro* sobre membros chave desta

via, nomeadamente, o mTOR e o S6K, que permitam, por um lado, conhecer melhor a sua expressão nos vários tipos de CUB, e clarificar a sua importância biológica como marcadores de ativação e possíveis alvos terapêuticos (Park *et alli*, 2011). Por outro lado a maioria dos estudos descritos na literatura incluem apenas doentes com tumores invasores da camada muscular e concentram-se em resultados obtidos através da técnica de “Tissue microarrays” (TMA). Esta metodologia, ao contrário da técnica de imunohistoquímica, não contempla a heterogeneidade biológica característica desta patologia (Chaux *et alli*, 2013).

II- Objetivos

A presente dissertação de mestrado tem por objetivo estudar se a via de sinalização mTOR está ativa quer nos CUB não invasores da camada muscular quer nos CUB invasores e metastáticos. Através de um estudo imunohistoquímico pretende-se avaliar a imunorreatividade das proteínas p-mTOR e p-S6 através de 3 formas qualitativas numa série de 96 casos de CUB humano:

- Percentagem de células tumorais positivas;
- Intensidade de marcação;
- Cálculo da multiplicação da percentagem de células tumorais positivas pela intensidade de marcação (*Hscore*);
- Avaliação do potencial de utilização do (*Hscore*) como parâmetro único no estudo da imunorreatividade destes anticorpos.

Pretende-se, igualmente, avaliar a correlação destas 2 proteínas e a sua associação com parâmetros clínicos patológicos.

III- Material e Métodos

3.1 - População

Foram estudados 96 casos de tumores registados e diagnosticados como CUB, admitidos e tratados no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro regional do Norte, entre o ano de 2003 e 2007. A seleção destes casos com CUB foi baseada na existência de dados de *follow-up* e da disponibilidade do material incluído em parafina.

Nesta série de trabalho, o tratamento cirúrgico com intenção curativa foi a RTU ou cistectomia radical, e os gânglios removidos por linfadenectomia associada à cistectomia radical (quando aconselhável). Assim, dos 96 casos estudados, em 30 foram isolados gânglios linfáticos e 11 deles apresentavam metástases.

As neoplasias foram classificadas histologicamente de acordo com os critérios propostos pela OMS de 2004. A classificação por graus e estádios foi realizada segundo a mesma classificação (Eble *et alli*, 2004).

3.2 - Estudo imunohistoquímico

Nesta série de trabalho estudou-se a imunoexpressão dos seguintes anticorpos: *Phospho*-mTOR (Ser2448) e *Phospho*-S6 (Ser235/236).

O estudo da imunorreatividade para estes anticorpos foi efetuado pelo método da Streptavidina-Biotina (Ultravision Dectetion Large volume Anti-polyvalent, Thermo Scientific LabVision), em cortes histológicos de tumor com 3 µm estendidos em lâminas de vidro revestidas com APES 3-aminopropiltrioxi-silano (C₉H₂₃NO₃Si) (Sigma Chemical Co.). As condições e soluções específicas para a técnica de imunohistoquímica seguiram as instruções do fornecedor e testes realizados no laboratório (anexo 1). Após a desparafinação e hidratação dos cortes histológicos, procedeu-se à inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogénio a 0,3%, de seguida realizou-se a recuperação antigénica em tampão citrato pH 6,0 em microondas a 600W, durante 15 minutos. Após o bloqueio com soro normal (Ultra V Block), foi feita

a incubação com os anticorpos primários durante 18 horas a 4°C e em câmara húmida: Phospho-mTOR (p-mTOR, Ser2448, 1:100; Cell Signaling Technology) e Phospho-S6 (p-S6, Ser235/236, 1:75; Cell Signaling Technology). A revelação realizou-se com a incubação dos cortes numa solução de Tris/HCl a 0,05M com 0,05% de 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorida e 0,01% de peróxido de hidrogénio. O contraste dos núcleos foi realizado com hematoxilina de Harris. Todas as séries incluíram um controlo negativo, substituindo-se o anticorpo primário por BSA a 2,5% em TBS, e um controlo positivo com imunorreatividade conhecida para o anticorpo monoclonal em estudo.

3.3 - Avaliação e quantificação da imunorreatividade

A imunorreatividade dos anticorpos primários foi avaliada através da visualização dos cortes histológicos por microscopia ótica. Cada corte histológico foi interpretado por dois observadores independentes e quando existiram divergências estas foram ultrapassadas pela observação conjunta.

A avaliação da imunorreatividade foi nuclear e citoplasmática (anexo 2). Para análise estatística somente o padrão predominante foi considerado, isto é, citoplasmática para p-mTOR e p-S6.

Para ambos os marcadores foi realizada uma análise qualitativa, considerando a percentagem de células marcadas e a intensidade da coloração, e estas foram organizadas em categorias como se pode observar nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 – Grupos formados para avaliação da positividade das células.

Percentagem de células marcadas	Categorias
0 ou <5%	0
5-24%	1
25-49%	2
50-74%	3
75-100%	4

Tabela 10 – Grupos formados para avaliação da intensidade da marcação.

Intensidade da Marcação	Categorias
Negativa	0
Fraca	1
Intermédia	2
Forte	3

Com base nesta avaliação foi elaborado um *Hscore* que consistiu na multiplicação da percentagem de células marcadas pela intensidade da marcação (Korkolopoulou, 2012).

3.4 - Análise estatística

Os resultados foram apresentados em tabelas de frequências absolutas e percentagens. A análise univariada foi efetuada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou pelo teste exato de Fisher quando apropriado. Foi calculada a correlação entre os dois marcadores imunohistoquímicos através da correlação do coeficiente de Spearman. Para o estudo estatístico utilizou-se o programa específico *SPSS 21.0® (Statistical Package for Social Sciences)* para Windows. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

IV – Resultados

4.1 Características clinico-patológicas

Na tabela 11 estão descritos os parâmetros clinico-patológicos dos 96 casos do CUB estudados.

Tabela 11 - Parâmetros clinico-patológicos da amostra estudada (n=96).

Parâmetros Clínico-Patológicos	
Idade, anos	
Mediana [min – máx]	69,50 [38-92]
Gênero, (n, %)	
Masculino	82(85,4)
Feminino	14(14,6)
Gânglios metastizados, (n, %)	
Não	19(19,8)
Sim	11(11,5)
Não isolados	68(68,8)
Estádio tumoral, (n, %)	
Ta	27(28,1)
T1	20(20,8)
T2	9(9,4)
T3	20(20,8)
T4	20(20,8)
Grau de diferenciação, (n, %)	
Baixo Grau	16(16,7)
Alto Grau	80(83,3)
Tipo de cirurgia, (n, %)	
RTU	32(33,3)
Cistectomia	64(66,7)
Tipo de tumor, (n, %)	
Primário	54(56,3)
Recidiva	42(43,8)

A idade dos doentes à data do diagnóstico variou entre os 38 e os 92 anos, com uma mediana de 69,5 anos. Desta amostra, 28 (29,2%) doentes faleceram por cancro e os restantes 68 (70,8%) estão vivos ou perdidos para *follow-up* ou faleceram por outras causas.

Nos 96 CUB estudados, 47 eram não invasores (27 casos Ta e 20 T1) e 49 eram invasores da camada muscular (19 casos T2, 20 casos T3 e 20 T4). Deste total, 16 eram de baixo grau de diferenciação (15 eram Ta e 1 T1) e 80 de alto grau (12 Ta, 19 T1, 9 T2, 20 T3 e 20 T4). Verificou-se que existe uma correlação estatisticamente significativa entre o grau e o estágio tumoral ($p < 0,01$), uma vez que todos os tumores uroteliais de baixo grau são não invasores (estádios Ta e T1; Tabela 12).

Tabela 12 - Grau de diferenciação e estádios dos CUBs estudados.

Grau de diferenciação	Estádio (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
Baixo grau	15(93,8)	1(6,3)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	<0,01
Alto grau	12(15,0)	19(23,8)	9(11,3)	20(25,0)	20(25,0)	

4.2 Expressão da proteína p-mTOR

Dos 96 CUB estudados, 18,8% (n=18) não apresentavam expressão da proteína p-mTOR. O intervalo de positividade com maior frequência encontra-se entre os 5%-24% com 32 casos (33,3%) como se pode observar na Tabela 13. Quanto à avaliação da intensidade de marcação o grupo mais frequente foi o que apresentava uma intensidade forte (n=35, 36,5%; Tabela 14).

Tabela 13 – Frequência da percentagem de células marcadas da proteína p-mTOR.

Categoria	N	%
0(Negativo)	18	18,8
1(5-24%)	32	33,3
2(25-49%)	24	25,0
3(50-74%)	11	11,5
4(75-100%)	11	11,5

Tabela 14 – Frequência da intensidade de marcação da proteína p-mTOR.

Categoria	N	%
0(Negativo)	18	18,8
1(Fraco)	9	9,4
2(Intermédio)	34	35,4
3(Forte)	35	36,5

Quando se multiplicou a percentagem de células marcadas pela intensidade de marcação, formando o *H-score*, observámos picos de frequência desde os negativos até às categorias correspondentes aos casos com maior percentagem de células e maior intensidade de marcação (Gráfico 1).

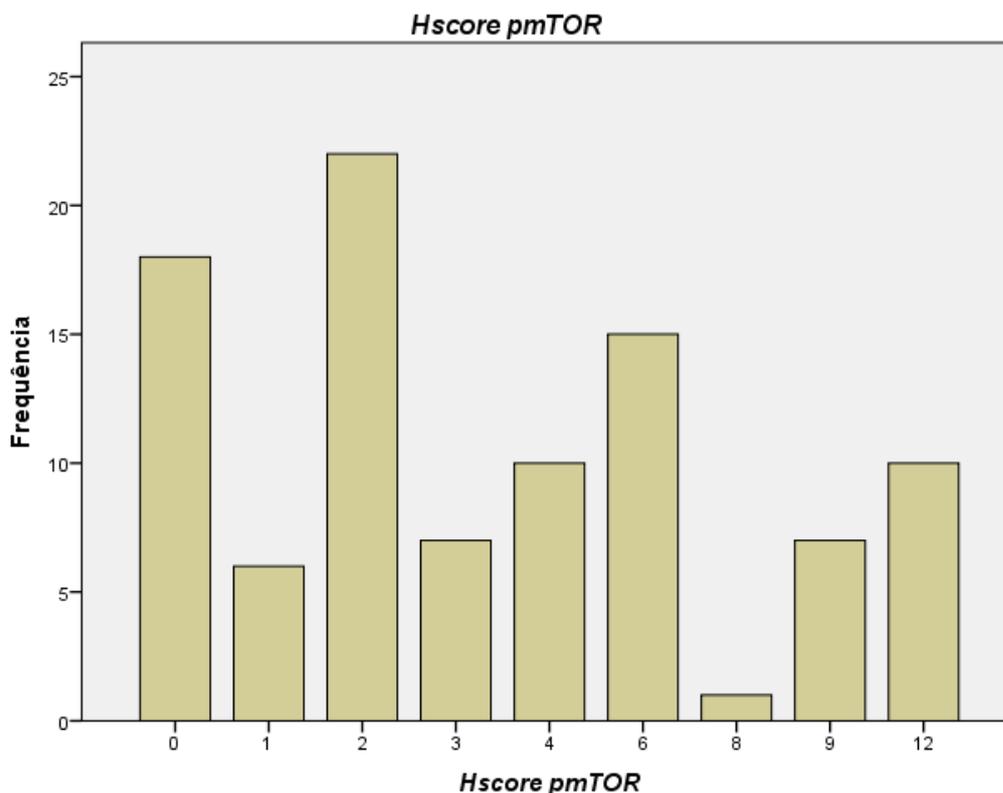


Gráfico 1 - Frequência das diversas categorias do *Hscore*.

4.2.1 Associação da proteína p-mTOR com o estágio e grau

A associação da percentagem de células positivas, intensidade e *Hscore* do mTOR com o estágio não foi estatisticamente significativa ($p=0,1$; $p=0,8$; $p=0,566$, respetivamente). Apesar de não se ter observado um padrão de distribuição da marcação pelos vários estádios, 72,7% dos casos com maior imunoexpressão (75-100%) correspondiam a tumores do estágio Ta (Tabela 15).

Tabela 15 – Percentagem de células marcadas com p-mTOR nos diferentes estádios.

Percentagem de células positivas	Estádio (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
0(Negativo)	3(16,7)	4(22,2)	1(5,6)	4(22,2)	6(33,3)	0,1
1(5-24%)	8(25,0)	7(21,9)	5(15,6)	7(21,9)	5(15,5)	
2(25-49%)	7(29,2)	5(20,8)	0(0,0)	6(25,0)	6(25,0)	
3(50-74%)	1(9,1)	3(27,3)	3(27,3)	2(18,2)	2(18,2)	
4(75-100%)	8(72,7)	1(9,1)	0(0,0)	1(9,1)	1(9,1)	

Em relação à intensidade de marcação, detetou-se uma marcação igualmente distribuída pelos diferentes estádios, embora a maioria dos casos com maior intensidade sejam Ta (Tabela 16).

Tabela 16 - Intensidade da marcação imunohistoquímica do p-mTOR nos diferentes estádios.

Intensidade p-mTOR	Estádio (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
0(Negativo)	3(16,7)	4(22,2)	1(5,6)	4(22,2)	6(33,3)	0,8
1(Fraco)	3(33,3)	3(33,3)	0(0,0)	1(11,1)	2(22,2)	
2(Intermédio)	8(23,5)	7(20,6)	5(14,7)	8(23,5)	6(17,6)	
3(Forte)	13(37,1)	6(17,1)	3(8,6)	7(20,0)	6(17,1)	

Quanto ao *Hscore*, 70% dos tumores da categoria mais levada eram Ta (Tabela 17).

Tabela 17 - *Hscore* do marcador p-mTOR em função do estádio.

<i>Hscore</i>	Estádio T (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
0	3(16,7)	4(22,2)	1(5,6)	4(22,2)	6(33,3)	0,566
1	2(33,3)	2(33,3)	0(0,0)	1(16,7)	1(16,7)	
2	5(22,7)	5(22,7)	3(13,6)	5(22,7)	4(18,2)	
3	2(28,6)	1(14,3)	2(28,6)	1(14,3)	1(14,3)	
4	3(30,0)	3(30,0)	0(0,0)	3(30,0)	1(14,3)	
6	3(20,0)	1(6,7)	2(13,3)	3(20,0)	6(40,0)	
8	1(100,0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
9	1(14,3)	3(42,9)	1(14,3)	2(28,6)	0(0,0)	
12	7(70,0)	1(10,0)	0(0,0)	1(10,0)	1(10,0)	

Em relação à proteína mTOR e grau de diferenciação, não se observaram associações estatisticamente significativas com nenhuma das formas de avaliação qualitativa deste marcador: $p=0,101$, $p=0,54$, $p=0,259$, respetivamente para a percentagem de positividade, intensidade e *Hscore* (Tabelas 18, 19, 20).

Tabela 18 - Percentagem de células positivas com o marcador p-mTOR em função do grau de diferenciação.

Percentagem de células positivas	Grau de diferenciação (n,%)		p
	Baixo Grau	Alto Grau	
0(Negativo)	2(11,1)	16(88,9)	0,101
1(5-24%)	5(15,6)	7(84,4)	
2(25-49%)	3(12,5)	21(87,5)	
3(50-74%)	1(9,1)	10(90,9)	
4(75-100%)	5(45,5)	6(54,5)	

Tabela 19 - Intensidade da marcação p-mTOR em função do grau de diferenciação.

Intensidade da marcação	Grau de diferenciação (n,%)		p
	Baixo Grau	Alto Grau	
0(Negativo)	2(11,1)	16(88,9)	0,541
1(Fraco)	2(22,2)	7(77,8)	
2(Intermédio)	4(11,8)	30(88,2)	
3(Forte)	8(22,9)	27(77,1)	

Tabela 20 - *Hscore* da marcação p-mTOR em função do grau de diferenciação.

<i>Hscore</i>	Grau de diferenciação (n,%)		p
	Baixo Grau	Alto Grau	
0	2(11,1)	16(88,9)	0.259
1	1(16,7)	5(83,3)	
2	4(18,2)	18(81,8)	
3	1(14,3)	6(85,7)	
4	1(10,0)	9(90,0)	
6	1(6,7)	14(93,3)	
8	0(0,0)	1(100,0)	
9	1(14,3)	6(85,7)	
12	5(50,0)	5(50,0)	

4.3 Expressão da proteína p-S6

Dos 96 CUB avaliados, foi excluído um caso, uma vez que o bloco escolhido já não contemplava zonas representativas do tumor.

Sendo assim, nos 95 casos avaliados 17 (17,7%) eram negativos para a proteína p-S6 e 31 (32,3%) apresentavam expressão da proteína no intervalo de 5% - 24% (Tabela 21).

Tabela 21 - Frequência da percentagem de células marcadas da proteína p-S6.

Categoria	N	%
0(Negativo)	17	18,8
1(5-24%)	31	33,3
2(25-49%)	14	25,0
3(50-74%)	17	11,5
4(75-100%)	16	11,5

Na avaliação da intensidade, 35 casos (36,5%) expressaram uma intensidade forte deste marcador (Tabela 22).

Tabela 22 - Frequência da intensidade de marcação da proteína p-S6.

Categoria	N	%
0(Negativo)	17	17,7
1(Fraco)	13	13,5
2(Intermédio)	30	31,3
3(Forte)	35	36,5

Em relação ao *Hscore*, e à semelhança da expressão da p-mTOR, observámos picos de frequência desde os negativos até às categorias correspondentes aos casos com maior percentagem de células e maior intensidade de marcação. (Gráfico 2)

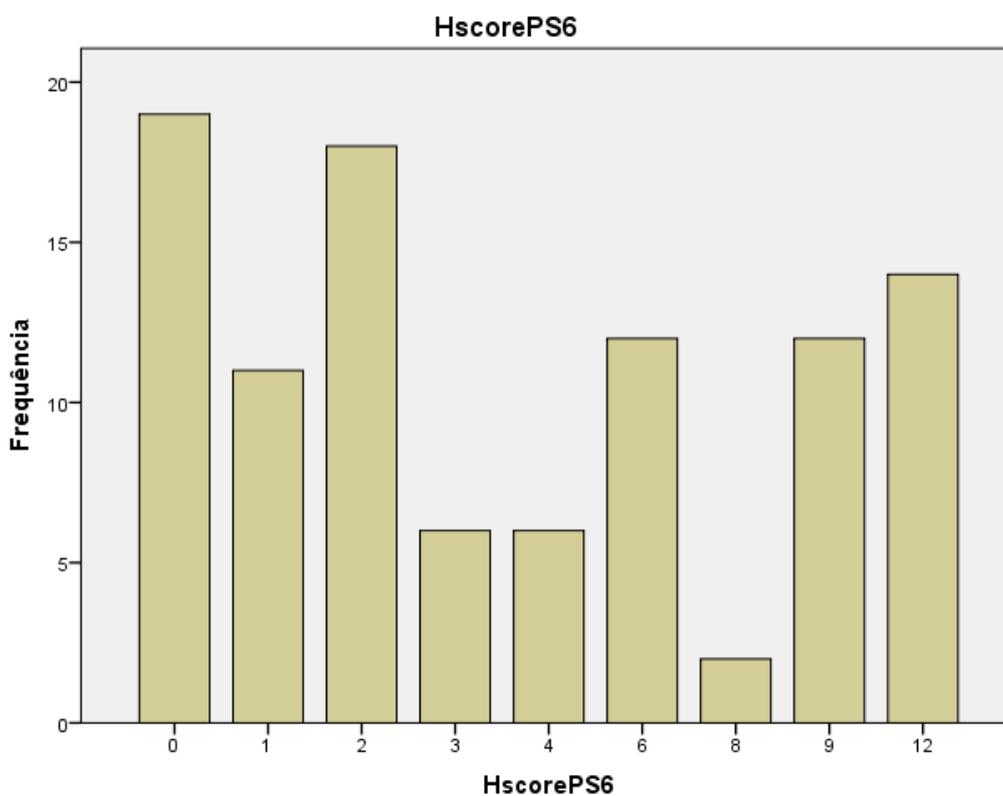


Gráfico 2 - Frequência das diversas categorias do *Hscore*.

4.3.1 Associação da proteína p-S6 com o estágio e grau de diferenciação

A associação da % de células marcadas para a proteína p-S6 e do *Hscore* com o estágio foi estatisticamente significativa ($p=0,021$ e $p= 0,007$ respetivamente). Observou-se uma maior frequência de casos em estágio mais baixo (sobretudo Ta) nas categorias de maior imunoposição e intensidade deste marcador. Esta tendência de marcação foi também observada na avaliação de intensidade, de forma isolada, no entanto, a associação não foi estatisticamente significativa ($p=0.065$) (Tabelas 23, 24 e 25).

Tabela 23 - Percentagem de células marcadas com p-S6 nos diferentes estádios.

Percentagem de células positivas	Estádio (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
0(Negativo)	2(11,8)	5(29,4)	1(5,9)	5(29,4)	4(23,5)	0,021
1(5-24%)	4(12,9)	9(29,0)	2(6,5)	8(25,8)	8(25,8)	
2(25-49%)	2(14,3)	4(28,6)	1(7,1)	4(28,6)	3(21,4)	
3(50-74%)	10(58,8)	0(0,0)	2(11,8)	2(11,8)	3(17,6)	
4(75-100%)	9(56,3)	1(6,3)	3(18,8)	1(6,3)	2(12,5)	

Tabela 24 - Intensidade da marcação imunohistoquímica do p-S6 nos diferentes estádios.

Intensidade p-S6	Estádio (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
0(Negativo)	2(11,8)	5(29,4)	1(5,9)	5(29,4)	4(23,5)	0,065
1(Fraco)	2(15,4)	5(38,5)	1(7,7)	3(23,1)	2(15,4)	
2(Intermédio)	5(16,7)	4(13,3)	4(13,3)	8(26,7)	9(30,0)	
3(Forte)	18(51,4)	5(14,3)	3(8,6)	4(11,4)	35 (14,3)	

Tabela 25 - *Hscore* do marcador p-S6 em função do estágio.

<i>Hscore</i>	Estádio T (n,%)					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
0	2(11,8)	5(29,4)	1(5,9)	5(29,4)	4(23,5)	0,007
1	1(9,1)	4(36,4)	1(9,1)	3(27,3)	2(16,7)	
2	2(11,1)	4(22,2)	1(5,6)	5(27,8)	6(33,3)	
3	2 (50,0)	2(50,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	
4	0(0,0)	1(16,7)	1(16,7)	2(33,3)	2(33,3)	
6	5(41,7)	2(16,7)	0(0,0)	3(25,0)	6(16,7)	
8	0(0,0)	0(0,0)	2(100,0)	0(0,0)	0(0,0)	
9	6(54,5)	0(0,0)	2(18,2)	1(9,1)	2(18,2)	
12	9(64,3)	1(7,1)	1(7,1)	1(7,1)	2(14,3)	

Relativamente à associação entre a proteína p-S6 e o grau de diferenciação observou-se uma associação estatisticamente significativa apenas com a avaliação da % de células positivas ($p=0,038$): os casos com mais de 50% de células marcadas correspondiam a alto grau de diferenciação (Tabela 26)

Quanto à intensidade da marcação e *Hscore* a associação não foi estatisticamente significativa ($p=0,347$ e $p=0,174$ respectivamente) no entanto, observa-se uma tendência semelhante em relação aos tumores de baixo grau de diferenciação. (Tabelas 27 e 28)

Tabela 26 - Percentagem de células positivas com o marcador p-S6 em função do grau de diferenciação.

Percentagem de células positivas	Grau de diferenciação (n,%)		p
	Baixo Grau	Alto Grau	
0(Negativo)	2(11,8)	15(88,2)	0,038
1(5-24%)	2(6,5)	29(93,5)	
2(25-49%)	1(7,1)	13(92,9)	
3(50-74%)	6(35,3)	11(64,7)	
4(75-100%)	5(31,3)	11(68,8)	

Tabela 27 - Intensidade da marcação p-S6 em função do grau de diferenciação.

Intensidade da marcação	Grau de diferenciação (n,%)		p
	Baixo Grau	Alto Grau	
0(Negativo)	2(11,8)	15(88,2)	0,347
1(Fraco)	2(15,4)	11(84,6)	
2(Intermédio)	3(10,0)	27(90,0)	
3(Forte)	9(25,7)	26(74,3)	

Tabela 28 - *Hscore* da marcação p-S6 em função do grau de diferenciação.

<i>Hscore</i>	Grau de diferenciação (n,%)		p
	Baixo Grau	Alto Grau	
0	2(11,9)	15(88,2)	0,174
1	0(0,0)	11(100,0)	
2	3(16,7)	15(83,3)	
3	1(25,0)	3(75,0)	
4	0(0,0)	6(100,0)	
6	1(8,3)	11(91,7)	
8	0(0,0)	2(100,0)	
9	4(36,4)	7(63,6)	
12	5(35,7)	9(64,3)	

4.4 Correlação entre o p-mTOR e p-S6

Usando a análise de correlação de Spearman, identificámos uma correlação positiva estatisticamente significativa entre estes dois marcadores imunohistoquímicos, quando avaliados pela expressão e *Hscore* ($p < 0,001$). Apesar destas associações, os coeficientes foram baixos ($\rho < 0,5$). Os resultados estão apresentados na tabela 29.

Tabela 29 - Coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e valor p entre p-mTOR e p-S6

	% Células positivas	Intensidade	<i>Hscore</i>
ρ	0,403	0,185	0,374
p	<0,001	0,073	<0,001

V- Discussão e Conclusão

Melhorias na compreensão do CUB e a sua oncogênese têm alimentado a atual busca de marcadores biológicos que possam ser direcionados para a terapêutica ou prognóstico (Schultz *et alii.* 2010). A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR tem sido ligada à tumorigênese em muitos tipos de carcinomas, nomeadamente nos CUB (Nawroth *et alii.*, 2011). Esta regula os processos celulares, incluindo sobrevivência, angiogênese e invasão. Estudos experimentais anteriores referem o mTOR, como um potencial alvo de interesse estando a sua ativação associada à diminuição da taxa de sobrevivência dos pacientes (Makhlin *et alii* 2009). Alterações da via AKT/PI3K/mTOR são muito frequentes em diversos tumores (Tigli *et alii.* 2013), incluindo CUB. Nomeadamente a perda do PTEN, aumento da expressão da AKT, mutações no PIK3CA são alterações bem caracterizadas em pacientes com CUB. (Makhlin *et alii* 2009).

Como já referido anteriormente, estudos dirigidos a moléculas chave nesta via como o mTOR e S6 são escassos em todo o espectro de lesões do CUB nomeadamente Ta. Acrescenta-se ainda algumas contradições relativamente à expressão dos marcadores referidos.

No presente trabalho foram estudados por imunohistoquímica uma série de 96 CUB não invasores e invasores da camada muscular de forma a avaliar a expressão da mTOR bem como o seu principal efetor S6.

Nesta amostra, verificou-se que existe uma correlação estatisticamente significativa entre o grau e o estágio tumoral ($p < 0,01$), uma vez que todos os tumores uroteliais de baixo grau são não invasores (estádios Ta e T1) o que em termos clinico-patológicos está de acordo com o descrito (Tanaka *et alii*, 2011).

Em relação à expressão do p-mTOR verificou-se que mais de 50% dos casos de CUB não apresentavam ou apresentavam uma baixa expressão desta proteína. No que respeita à intensidade da mesma observou-se que os casos com percentagem de células positivas encontravam-se nas categorias intermédias-forte. Os resultados do *Hscore* refletiram as tendências anteriormente observadas.

Quando estudada a associação da proteína p-mTOR com o estágio e o grau de diferenciação não foi encontrado um resultado estatisticamente significativo, relativamente às três variáveis qualitativas estudadas. No entanto, a maioria dos casos com elevada imunexpressão correspondiam ao estágio Ta. Nos tumores invasores não se encontrou uma elevada expressão do mTOR ao contrário do descrito na literatura (Hansel *et alii*, 2010; Sun *et alii*, 2011).

Em relação à proteína p-S6 também se verificou que 50% dos casos eram negativos ou com baixa percentagem de células marcadas apesar da intensidade da marcação variar entre intermédia e forte. Mais uma vez o *Hscore* refletiu as tendências demonstradas relativamente à associação da proteína p-S6 e o estágio: esta foi estatisticamente significativa com a percentagem de células marcadas e o *Hscore*. A percentagem de células marcadas era maior no estágio Ta em oposição aos estágios mais avançados incluindo T1 em que a percentagem de células marcadas era diminuta; este resultado vai de encontro ao estudo recentemente realizado por Gonzalez-Roibon e colaboradores (Gonzalez-Roibon *et alii*, 2013). Relativamente à intensidade da marcação não houve um resultado estatisticamente significativo.

Em função do estágio obtivemos uma associação estatisticamente mais significativa o que pode sugerir a utilização deste parâmetro isoladamente no estudo da imunorreatividade deste anticorpo.

Na associação do p-S6 com o grau de diferenciação do tumor obtivemos uma relação estatisticamente significativa apenas com a percentagem de células marcadas: Os CUB de baixo grau de diferenciação apresentaram uma maior percentagem de células marcadas enquanto que os CUB de alto grau não apresentavam ou tinham fraca expressão da mesma.

Neste estudo foi possível encontrar uma correlação positiva entre os marcadores imunohistoquímicos estudados, p-mTOR e p-S6. Este resultado está concordante com a localização destas proteínas na via de sinalização PI3K/AKT/mTOR e ativação da mesma. Com efeito a S6 é um substrato direto da mTOR, permitindo a iniciação da tradução proteica.

No presente estudo foram encontrados alguns resultados discordantes com os descritos na literatura. Este facto poderá dever-se ao facto de não ter sido utilizado TMA mas sim corte histológico do tumor. A utilização dos cortes histológicos poderá dificultar a avaliação qualitativa e interpretação do sinal expresso uma vez que a amostra contempla todas as estruturas tecidulares, quer tumorais quer normais. Por outro lado comparativamente aos TMAs consegue-se preservar a arquitetura tecidular da amostra e assim ter uma visão mais global da lesão. Outros aspetos técnicos que poderão explicar estas discrepâncias são a preservação e recuperação dos antigénios, procedimentos de marcação e métodos de avaliação. Em relação a este último ponto é de salientar não só a localização (nuclear/citoplasmática) e padrão da marcação como também a forma de avaliação da mesma: a leitura da intensidade e a marcação é um parâmetro muito subjetivo dependente da experiência e conhecimento do observador.

O *Hscore* poderá ser uma forma de diluir esta subjectividade na interpretação dos resultados, o que poderá traduzir de uma forma mais clara a relação entre estes marcadores e as diferentes variáveis clinico-patológicas.

O facto de se ter avaliado apenas estes dois membros desta importante cascata de sinalização e o número de casos observados constituem uma limitação deste estudo. Com efeito é fundamental realizar novos estudos que incluam outros marcadores biológicos a montante e a jusante do mTOR, nomeadamente inibidores desta via, bem como aumentar o número de amostras histológicas não só de tumores invasores mas também superficiais. Só assim será possível compreender o papel desta via na carcinogénese do CUB, identificando potenciais alvos terapêuticos.

VI – Bibliografia

Babjuk, M. (2009). Transurethral Resection of Non–muscle-invasive Bladder Cancer. *European Urology Supplements*, Volume 8, capítulo7, pp. 542-548.

Babjuk, M. *et alii.* (2009). Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS) (Edição reduzida). *European Association of Urology*, pp. 7-17.

Babjuk, M. *et alii.* (2014). Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS). *European Association of Urology*, pp. 1-48.

Babjuk, M. *et alii.* (2013). GUIDELINES ON NON-MUSCLE INVASIVE (Ta, T1, CIS) BLADDER CANCER. *European Urology*, pp. 7-18.

Babjuk, M. *et alii.* (2013). Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and CIS) (Edição reduzida). *European Association of Urology*, pp. 1-22.

Bhaskar, P. e Hay, N. (2007). The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*, 12(4), pp.487-502.

Birder, L. (2005). More than just a barrier: urothelium as a drug target for urinary bladder pain. *American Journal of physiology. Renal physiology*, 289, pp. 489-495.

Burger, M. *et alii.* (2013). Epidemiology and Risk Factors of Urothelial Bladder Cancer. *European Urology*, 63, pp. 234-241.

Carrera, A. (2004). TOR signaling in mammals. *Journal of Cell Science*, 117, pp. 4615-4616.

Cancer Research UK Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/bladder/incidence/uk-bladder-cancer-incidence-statistics>. [Consultado em 20/02/2013].

Cariou, G., Maaraoui, N. e Cortesse, A. (1997). [Can the combination of bladder ultrasonography and urinary cytodiagnosis replace cystoscopy in the

diagnosis and follow-up of tumors of the bladder?]. *Progrès en urologie: Journal de l'Association française de urologie et de la Société française d'urologie*, 7(1), pp. 51-55.

Chaux, A. *et alii.* (2013). High levels of phosphatase and tensin homolog expression are associated with tumor progression, tumor recurrence, and systemic metastases in pT1 urothelial carcinoma of the bladder: a tissue microarray study of 156 patients treated by transurethral resection. *Urology.*, 81(1), pp. 116-22.

Chen, M. *et alii.* (2009). Genetic variations in PI3K-AKT-mTOR pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* vol.30 no.12 pp. 2047-2052.

Chen, M., *et alii.* (2010). Genetic variations of the PI3K-AKT-mTOR pathway and clinical outcome in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *Oxford Journals*, 31(8), pp. 1387-1391.

Ching, C., Hansel, D. (2010). Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory Investigation*, volume 90, pp. 1406-1414.

Chou, R., Dana, T. (2010). Screening Adults for Bladder Cancer: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, 15, pp. 461-468.

Chu, H., Wang, M., Zhang, Z. (2013). Bladder cancer epidemiology and genetic susceptibility. *The Journal of Biomedical Research*, 27(3), pp. 170-178.

Claderaro, J. *et alii.* (2014). PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 134, pp. 1776-1784.

Cohen, SM., Shirai, T., Steineck G. (2000). Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scandinavian journal of Urology and Nephrol supplementum*, (205), pp. 105-115.

Couty, S. *et alii.* (2013). The discovery of potent ribosomal S6 kinase inhibitors by high-throughput screening and structure-guided drug design. *Oncotarget*, Vol.4, No 10, pp. 1647-1661.

Deeley, T., Desmet, V. (1963). The Classification of Bladder Tumours. *British journal of cancer*, 17, pp. 41-45.

Eble, J. *et alii*. (2004). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. *IARC Press*, pp. 94-95.

Efeyan, A. e Sabatini, D. (2010). mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 22, pp. 169-176.

Evelyne, C., Rosette, J., Reijke, T. (2011). Emerging optical techniques in advanced cystoscopy for bladder cancer diagnosis: A review of the current literature. *Indian Journal of Urology*, 27(2), pp. 245-251.

Fahmy, M. *et alii*. (2013). Relevance of the mammalian target of rapamycin pathway in the prognosis of patients with high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Human Pathology*, 44(9), pp. 1766-1672.

Flezar, M. (2010). Urine and bladder washing cytology for detection of urothelial carcinoma: standard test with new possibilities. *Radiology and oncology*, 44(4), pp. 207-214.

Ferrís, J. *et alii*. (2013). Environmental non-occupational risk factors associated with bladder cancer. *Actas urologicas españolas*, 37(9), pp. 579-586.

Galsky, D. e Hall, S. (2010). Bladder Cancer: Current Management and Opportunities for a Personalized Approach. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 77, pp. 587-596.

GLOBOCAN 2008, International Agency for Research on Cancer Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/>. [Consultado em 11/03/2013].

Gonzalez-Roibon, N. *et alii*. (2013). Dysregulation of mammalian target of rapamycin pathway in plasmacytoid variant of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Human Pathology*, 44(4), pp. 612-622

Goodison, S., Rosser, C. e Urquidi, V. (2013). Bladder Cancer Detection and Monitoring: Assessment of Urine- and Blood-Based Marker Tests. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 17(2), pp. 71-84.

Grupo Português Genito Urinário 2011 Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.gpgu.org/Default.aspx?ID=15&PID=57&Action=1&NewsId=139>. [Consultado em 11/02/2014].

Gust, K., So, A., 2009. The role of mTOR in bladder cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 8:24, pp. 2348-2350.

Hansel, D., *et alii* 2010. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Regulates Cellular Proliferation and Tumor Growth in Urothelial Carcinoma. *The American Journal of Pathology*, volume.176, n. 6, pp. 3062-3072.

Hay, N. (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer cell*, Vol.8, pp. 179-183.

Hoeffler, C. e Klann, E. (2009). mTOR Signaling: At the Crossroads of Plasticity, Memory, and Disease. *Trends Neurosci.* 33(2): 67, pp. 1-17

Hughes, M. *et alii*. (2011). Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective. *Oxford Journals Toxicological Sciences*, 123(2), pp. 305-332.

Jacobs, B., Lee, C., Montie, J. (2010). Bladder Cancer in 2010 How Far Have We Come?. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60, pp. 244-272.

Jankovic, S., Radosavljevic, V. (2007). Risk factors for bladder cancer. *Tumori*, 93(1), pp. 4-12.

Jemal, A. *et alii*. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), pp. 69-90.

Jichlinski, P., Jacqmin, D. (2008). Photodynamic Diagnosis in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European Urology Supplements* 7, pp. 529-535.

- Jin, X. *et alii.* (2014). Diagnosis of bladder cancer and prediction of survival by urinary metabolomics. *Oncotarget*, Vol.5, Nº6, pp. 1635-1645.
- Johanson, SL., Cohen, SM. (1997). Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Seminars in Surgical Oncology*, 13(5), pp. 291-298.
- Joshi, A., Preslan, E. (2011). Risk factors for bladder cancer: challenges of conducting a literature search using PubMed. *Perspectives in Health Information Management / AHIMA, American Health Information Management Association*, 1, pp. 8-1e.
- Takehi, Y. *et alii.* (2010). Bladder Cancer Working Group Report. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, (Supplement 1), pp. 57-64.
- Knowles, M. *et alii.* (2009). Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 28(3-4), pp. 305-316.
- Korkolopoulou, P. *et alii.* (2012). A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma. *BJU Internacional*, 110, pp. 1237-1248.
- Lapante, M. e Sabatini, D. (2009). mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122, pp. 3589-3594.
- Lapante, M. e Sabatini, D. (2012). mTOR Signaling. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp. 1-3.
- Letašiová, S. *et alii.* (2012). Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environmental Health*, 11(Suppl 1):S11.
- Leung, H., Griffiths, T., Neal, D. (1996). Bladder cancer. *Postgraduate Medical Journal*, 72 (854), pp. 719-724.

Lewis, S. (2000). Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. . *American Journal of physiology. Renal physiology*, 278, pp. 867-874.

Makhlin, I., *et alii* (2011). The mTOR pathway affects proliferation and chemosensitivity of urothelial carcinoma cells and is upregulated in a subset of human bladder cancers. *BJU Internacional*, 108(2B), pp 84–90.

Mansure, J. *et alii.*, (2009). Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 8:24, pp. 2339-2347.

Moon, G. *et alii.* (2014). NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor synergistically potentiates the antitumor effects of cisplatin in bladder cancer cells. *International Journal of Oncology*, 45(3), pp. 1021-1035.

Naranmandura, H. *et alii* (2011). Comparative toxicity of arsenic metabolites in human bladder cancer EJ-1 cells. *Chemical research in toxicology*, 24(9), pp. 1586-1596.

National Cancer Institute (NCI) Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/bladder>. [Consultado em 16/04/2014].

Naujokas, M. *et alii* (2013). The Broad Scope of Health Effects from Chronic Arsenic Exposure: Update on a Worldwide Public Health Problem. *Environ Health Perspective*, 121(3), pp. 295-302.

Nawroth, R., *et alii.* (2011). S6K1 and 4E-BP1 Are Independent Regulated and Control Cellular Growth in Bladder Cancer. *Plos One*, volume 6, pp. 1-11.

Nóbrega, C. *et alii.* (2013). In vivo and in vitro effects of RAD001 on bladder cancer. *Urology Oncology*, 31 (7), pp. 1212-21.

Organização Mundial de Saúde (O.M.S) Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. [Consultado em 20/03/2013].

Park, S., Lee, T. e Chang, I. (2011). Role of the mTOR Pathway in the Progression and Recurrence of Bladder Cancer: An Immunohistochemical Tissue Microarray Study. *Korean Journal of Urology*, 52, pp. 466-473.

Pelucchi, E. *et alii.* (2006). Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nature Clinical Practice Urology*, 3 (6), pp. 317-340.

Pontes, L., Silva, M., Matoso, F. (2009). Registo Oncológico Nacional – 2005.

Pópulo, H., Lopes, J., Soares, P. (2012). The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, pp. 1886-1918.

Puzio-Kuter, A. *et alii.* (2009). “Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer”. *GENES & DEVELOPMENT*, 23, pp. 675-680.

Rafnar, T. *et alii.* (2011). European genome-Wide association study identifies SLC14A1 as a new urinary bladder cancer susceptibility gene. *Human Molecular Genetics*, Vol. 20, No. 21, pp. 4268-4281.

Repositório – Tumor da bexiga. Visão de um urologista Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://repositorio.hff.min-saude.pt/bitstream/10400.10/746/1/Tumor%20da%20Bexiga.pdf> [Consultado em 20/010/2013].

Roreno - Registo Oncológico Regional do Norte-2008 Home Page. [Em linha]. Disponível em <http://www.roreno.com.pt/pt/publicacoes/publicacoes-cientificas.html>. [Consultado em 20/02/2013].

Schultz, L., *et alii.* (2010). Expression Status and Prognostic Significance of Mammalian Target of Rapamycin Pathway Members in Urothelial Carcinoma of Urinary Bladder After Cystectomy. *Wiley OnlineLibrary*, pp. 5517-5526.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer Statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63 pp. 11-30.

Sobin, LH. (1978). The WHO histological classification of urinary bladder tumours. *Urological Research*, 6(4), pp. 193-5.

Sun, C., Chang, Y., Pan, C. (2011). Activation of the PI3K / Akt / mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology*, 58, pp. 1054-1063.

Tanaka, T. *et alii*. (2011). Pathobiology and Chemoprevention of Bladder Cancer. *Journal of Oncology*, Vol. 2011, pp. 1-23.

Tigli, H. *et alii*. (2013). LKB1 Mutations and Their Correlation With LKB1 and Rheb Expression in Bladder Cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 52(8), pp. 660-665.

Vishnu, P., Mathew, J., Tan, W. (2011). Current therapeutic strategies for invasive and metastatic bladder cancer. *Onco Targets and Therapy*, 4, pp. 97-113.

Vogler, H., Rothkopf, M. e Mebel, M. (1975). Experiences based on the classification of bladder tumours according to the TNM system. *European Urology*, 1(2), pp. 93-5.

Witjes, J. *et alii*. (2014). Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *European Association of Urology*, pp. 1-82.

Wu, X. *et alii*. (2008). Epidemiology and genetic susceptibility to bladder cancer. *BJU International*, 102(9 Pt B), pp. 1207-1215.

Anexos

Anexo I - Protocolo de Imunohistoquímica

- 1.** Desparafinação e Hidratação
- 2.** Inibição da peroxidase endógena (Peróxido de Hidrogénio a 3%)
- 3.** Lavagem com PBS-tween 20
- 4.** Recuperação antigénica em tampão citrato pH 6,0, micro-ondas a 600w
- 5.** Lavagem com PBS-tween 20
- 6.** Incubação com soro normal UV Block (Labvision)
- 7.** Incubação com soro primário monoclonal
 - Phospho-mTOR (p-mTOR, Ser2448, 1:100; Cell Signaling Technology)
 - Phospho-S6 (p-S6, Ser235/236, 1:75; Cell Signaling Technology)
- 8.** Lavagem com PBS-tween 20
- 9.** Incubação com anticorpo secundário biotinizado (Thermo Scientific Lab Vision);
- 10.** Lavagem com PBS-tween 20
- 11.** Incubação com complexo Streptavidina (Thermo Scientific Lab Vision);
- 12.** Lavagem com PBS
- 13.** Revelação com 3,3-diaminobenzidina (DAB, Thermo Scientific Lab Vision);
- 14.** Lavagem em água destilada
- 15.** Contraste com Hematoxilina de Harris
- 16.** Lavagem em água corrente
- 17.** Desidratação, diafanização e montagem

Anexo II - Imunorreatividade do p-mTOR

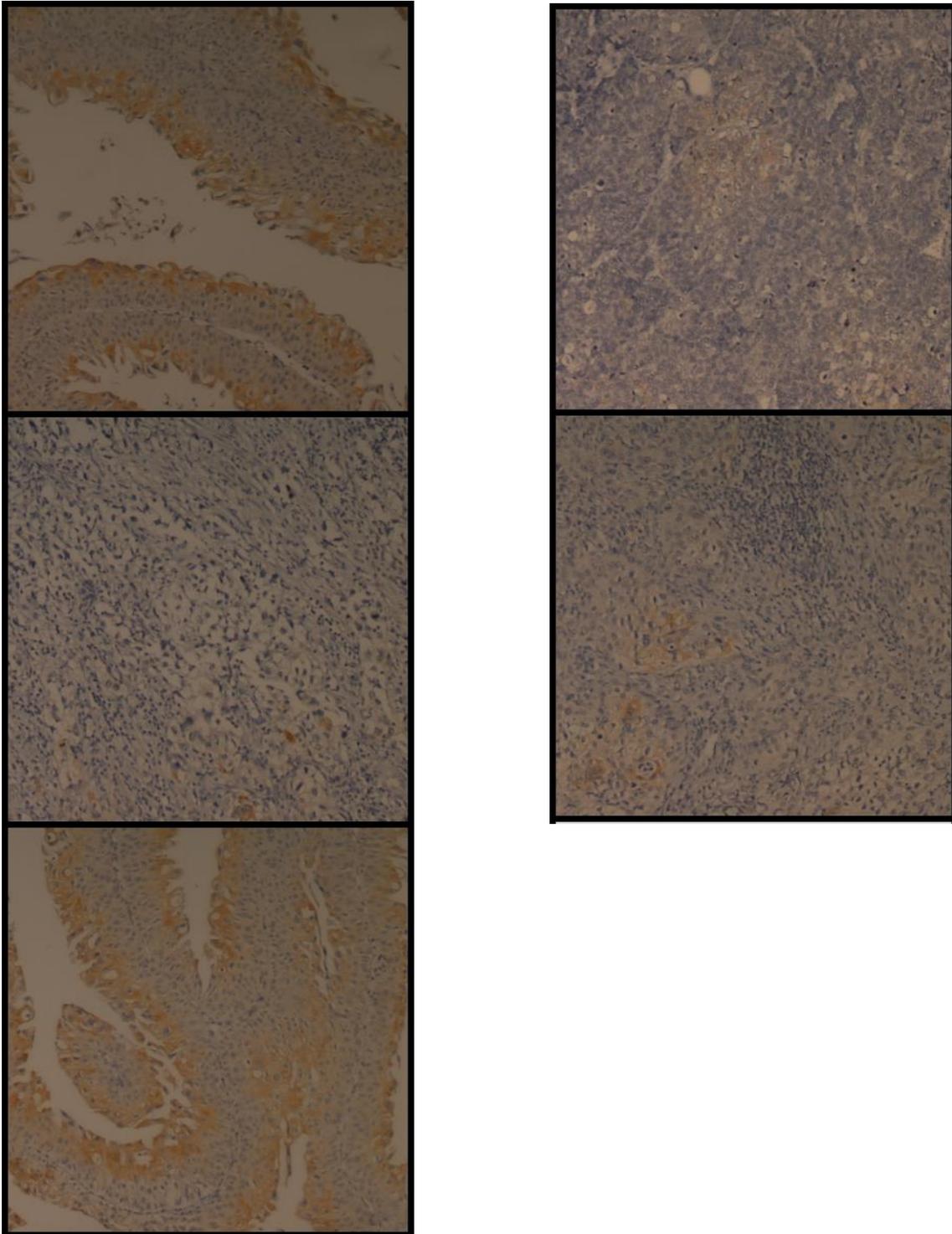


Fig. 6 – Imunorreatividade da proteína p-mTOR no carcinoma da bexiga. Ampliação 100x.

Anexo III - Imunorreatividade do p-S6

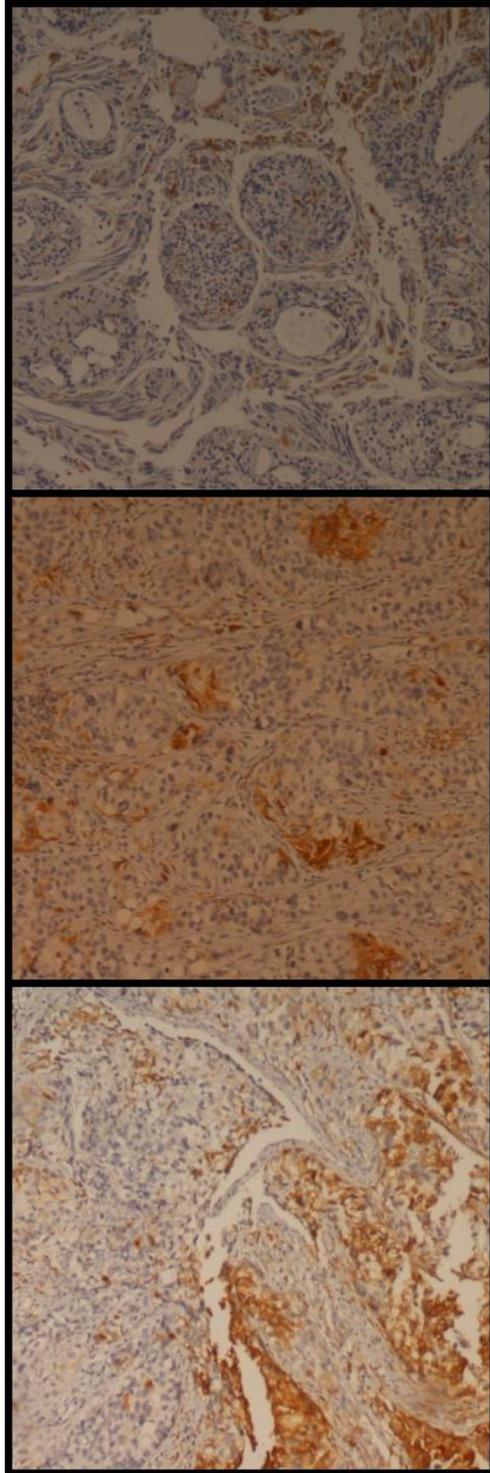


Fig. 7 – Imunorreatividade da proteína p-S6 no carcinoma da bexiga. Ampliação 100x.