



2013

Caracterização do perfil genómico do Cancro da Bexiga – Contribuição para o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico e monitorização molecular

João Filipe Delgado dos Santos



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização do perfil genómico do Cancro da Bexiga – Contribuição para o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico e monitorização molecular

João Filipe Delgado dos Santos

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Caracterização do perfil genómico do Cancro da Bexiga - Contribuição para o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico e monitorização molecular

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Marques Carreira (Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Carmen Alpoim (Universidade de Coimbra).

João Filipe Delgado dos Santos

2013

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, pela orientação deste projecto, por todo o acompanhamento, pelo apoio incondicional que me prestou, pela voz crítica que em muito me ajudou. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos e incentivo sempre demonstrado durante este ano de trabalho. Por fim um muito obrigado pela oportunidade e confiança depositada em mim para a realização deste aliciente projecto.

À Professora Doutora Joana Barbosa de Melo, pela co-orientação durante este ano. Obrigado por todo o apoio incondicional, pelo entusiasmo transmitido aquando da avaliação dos resultados e por todo o incentivo. Obrigada por estar sempre atenta às minhas novas ideias e por me permitir testar algumas delas mesmo quando apenas a minha intuição servia de base. Muito obrigada também pela oportunidade e confiança depositada em mim para a realização deste projecto.

À Professora Doutora Carmen Alpoim, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra pela orientação interna. Obrigada por possibilitar o contacto directo entre a Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Ao Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, na pessoa do seu director Sr. Prof. Doutor Alfredo Mota, pela oportunidade de desenvolver este estudo em colaboração com o referido serviço. Em especial ao Dr. Belmiro Parada, pela essencial colaboração neste projecto. Obrigado por todo o empenho e interesse, por todos os esclarecimentos prestados e pelo entusiasmo transmitido aquando da discussão dos resultados obtidos. Obrigado por tornar possível a realização deste projecto

À Ilda Ribeiro, o incondicional apoio, incentivo, paciência e disponibilidade que tanto contribuíram para o sucesso deste estudo. Obrigado por todos os momentos de discussão, pelo espírito crítico e por todos os momentos em que me trouxeste à realidade quando os resultados indicavam que tudo seria perfeito. Obrigada também, pela amizade demonstrada em todos os dias deste último ano. Desculpa as imensas vezes em que perturbei o teu trabalho para esclarecer alguma dúvida. Obrigada por TUDO.

Ao José Ferrão, Miguel Pires e à Susana Ferreira, por todos os ensinamentos transmitidos, pelas horas de discussão dos resultados e pelo incentivo transmitido mesmo nos momentos em que as coisas não corriam da melhor forma. Obrigado também pelas críticas, pelo olhar experiente e pela paciência que sempre tiveram para me ouvir. Para além disso, pela importante amizade e companheirismo e desculpem todos os momentos em que demonstrei não compreender a vossa falta de tempo durante este ano.

À Claudia Pais e à Patrícia Paiva, pelos ensinamentos transmitidos na área da cultura de células e pela contínua ajuda. Obrigado pela paciência, pelo tempo dispendido na tentativa de unir esforços para compreender as dificuldades existentes e também pela amizade demonstrada.

Ao Dr. Francisco Caramelo, pelo essencial apoio no tratamento informático e estatístico dos resultados obtidos. Muito obrigado pela disponibilidade, interesse e colaboração.

À Alexandra Mascarenhas, Ana Jardim, Lúcia Simões, Marta Pinto, Nuno Lavoura, Carla, Sónia e Susana, pelo apoio, preocupação e disponibilidade que sempre demonstraram.

A todos os alunos, Mariana Alves, Mariana Val, João Fonseca, Liliana Silva, Roberta Dutra e Hélder Gomes pelo companheirismo, apoio e amizade. Em especial à Ana Domingues e ao Sérgio Portovedo, meus colegas de aventura que foi a realização das nossas dissertações de mestrado na área da genética do cancro. Obrigada pelos momentos de discussão e ideias partilhadas.

Aos Doentes, que generosamente aceitaram participar neste estudo.

A todos os meus amigos pelas horas de conversa, pelos momentos de diversão e essencialmente pelo apoio e compreensão das minhas longas ausências.

A toda a minha Família, que compreenderam as minhas ausências, durante estes vários meses e que, dessa forma, me substituíram nos momentos em que deveria estar presente. Um muito obrigado pela generosa e preciosa ajuda na recuperação da minha mãe.

Um enorme OBRIGADO aos meus pais, pelo incondicional suporte, pela incondicional paciência e pelo incondicional desejo de me verem feliz e bem na vida. Obrigado por me ensinarem a não baixar os braços e a lutar pelos meus desejos. Sem vocês tudo isto não seria possível.

À minha irmã, pelo exemplo que é e pela forma como sempre me tenta ajudar mesmo nos momentos de maior dificuldade. Obrigada pela paciência, preocupação e pelos “abanões” que me dás.

À minha avó, Justina Delgado, que apesar de nos ter deixado numa das fases mais atribuladas da minha vida, foi, é e será sempre um dos meus pilares. Obrigado pela pessoa que “és”, pela pessoa que me fizeste ser, pelo orgulho que tinhas em mim e pela forma como sempre sorrreste para mim, até ao último dia.

Resumo

O cancro da bexiga (CB) é considerado uma das neoplasias mais comuns do tracto urinário sendo a quarta neoplasia mais frequente no sexo masculino e a décima quarta no sexo feminino, correspondendo a cerca de 5 a 10% do total de neoplasias na Europa. A principal problemática associada ao CB é a elevada taxa de recidiva. Cerca de 50 a 80% dos tumores superficiais irão apresentar recidivas e cerca de 10-15% irão progredir para formas neoplásicas mais agressivas, num período de cinco anos. Deste modo, o principal objectivo da investigação nesta área passa pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias que permitam o diagnóstico e a detecção de recidivas desta neoplasia o mais precocemente possível e de forma eficaz. Actualmente, já se encontram disponíveis alguns biomarcadores, contudo estes apresentam baixas taxas de sensibilidade e especificidade.

Os principais objectivos deste estudo foram a caracterização do perfil genómico do CB bem como o estudo do estado de metilação de genes relacionados com esta neoplasia. Por outro lado, pretendeu-se também avaliar a capacidade de utilização da urina como material biológico para uma metodologia não invasiva na obtenção de células tumorais. Neste estudo foram estudadas 14 biópsias tumorais por MLPA e MS-MLPA, das quais 13 foram também avaliadas por aCGH. A urina correspondente a 12 das 14 amostras foram também avaliadas por MLPA.

Verificou-se a existência de padrões de alterações muito evidentes entre as amostras estudadas. Por MLPA, as alterações mais frequentes corresponderam a perdas nos cromossomas 7q, 9p, 9q e 17q e ganhos nos cromossomas 3p, 3q, 7p, 10q, 17q e 20q. Por outro lado, por MS-MLPA foi possível detectar uma elevada taxa de incidência de perdas associadas ao gene *TP53*. Os genes *MSH6*, *PAX5* e *KLLN* apresentaram-se muito frequentemente metilados nas amostras estudadas. Por aCGH foi igualmente possível identificar padrões de alterações muito evidentes, porém a sua associação com o estadio e o grau tumoral não foi clara. Quanto ao estudo por MLPA de amostras provenientes de urina, foi possível obter resultados estatisticamente significativos para vários genes. Deste modo, a utilização da urina como metodologia não invasiva para o estudo e caracterização tumoral, mostra-se extremamente promissora.

Palavras-chave: Cancro da bexiga, alteração genética, urina, MLPA, MS-MLPA.

Abstract

Bladder cancer (BC) is one of the most common malignancies of urinary tract being the fourth most common neoplasia in men and the fourteenth in woman, accounting with 5 – 10% of all malignancies in Europe. Bladder tumors have high recurrent rates and 50 to 80% of superficial tumors will recur and 10 to 15% will progress to more aggressive neoplasias, within five years. The main goal of research in this field is to optimize or develop new strategies that will allow an early and efficient diagnosis and a detection of recurrences. Nowadays, there are some biomarkers that can be used in clinical practice, however these markers have low sensitivity and specificity rates.

The main goals of this study were the characterization of the genomic profile of bladder cancer and the evaluation of the methylation profile of some genes related with this neoplasia. On the other hand, in this study the ability of using urine as a source of bladder cancer cells for a non-invasive method was evaluated. 14 tumor biopsies were studied by MLPA and MS-MLPA, which 13 were also studied by aCGH. Urine from 12 of 14 studied samples, were also studied by MLPA.

Some genetic and epigenetic alterations patterns were identified. By MLPA, the most common changes were losses in chromosomes 7q, 9p, 9q and 17q and gains in chromosomes 3p, 3q, 7p, 10q, 17q and 20q. On the other hand, by MS-MLPA a high frequencies of losses of *TP53* gene were detected. *MSH6*, *PAX5* and *KLLN* genes showed a high methylation rate. By aCGH some genetic alterations patterns were also detected, however their association with tumor stage and grade were not clear. The study of urine samples by MLPA revealed concordance, with statistical significance for some genetic alterations. Thus, the use of urine as a non-invasive strategy for bladder tumor study and characterization is very promising.

Key-words: Bladder cancer, genetic alteration, urine, MLPA, MS-MLPA.

Índice geral

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
ÍNDICE GERAL	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS.....	XVII
LISTA DE ANEXOS.....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XXI
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
1. O CANCRO DA BEXIGA.....	1
2. TAXAS DE INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CANCRO DA BEXIGA	3
3. FACTORES DE RISCO ASSOCIADOS AO CANCRO DA BEXIGA	5
4. CLASSIFICAÇÃO ANATOMO-PATOLÓGICA DO CANCRO DA BEXIGA	7
5. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CANCRO DA BEXIGA	11
6. METODOLOGIAS DE DIAGNÓSTICO DO CANCRO DA BEXIGA	12
6.1. Técnicas de imagem.....	12
6.2. Citologia urinária.....	13
6.3. Cistoscopia	13
6.4. Diagnóstico molecular.....	14
7. TRATAMENTO DO CANCRO DA BEXIGA	16
8. A INSTABILIDADE GENÉTICA E AS VIAS MOLECULARES ENVOLVIDAS NO CANCRO DA BEXIGA	17
8.1. O cancro e a instabilidade genética	17
8.2. Genes e vias moleculares com relevância no processo de carcinogénese da bexiga.....	19
8.2.1. O gene <i>PIK3CA</i>	21
8.2.2. O gene <i>FGFR3</i>	22
8.2.3. Os genes <i>CDKN2A</i> e <i>CDKN2B</i>	22
8.2.4. O gene <i>TSC1</i>	23
8.2.5. Alterações epigenéticas	23
9. A URINA COMO INTERMEDIÁRIO DO DIAGNÓSTICO DO CANCRO DA BEXIGA	23
10. TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÓMICA COMO MEIOS DE DIAGNÓSTICO DO CANCRO DA BEXIGA	24
10.1. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA.....	25
10.2. Methylation-specific MLPA - MS-MLPA	27
10.3. Array-based Comparative Genomic Hybridization - aCGH	28
10.4. Outras técnicas complementares	30
11. OBJECTIVOS.....	30
CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1. PACIENTES E AMOSTRAS.....	35
2. EXTRACÇÃO DE DNA.....	36

2.1.	Extracção de DNA de biópsias tumorais e de controlos	36
2.2.	Extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina	37
3.	QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS	37
4.	ANÁLISE POR MLPA	38
5.	ANÁLISE POR MS-MLPA	39
6.	ANÁLISE POR ACGH.....	45
7.	CULTURA DE CÉLULAS	46
8.	ANÁLISE POR FISH.....	46
9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 51

1.	CARACTERIZAÇÃO DOS DOENTES ENVOLVIDOS NO ESTUDO	51
2.	OPTIMIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE EXTRACÇÃO DE DNA.....	52
2.1.	Método QIAamp® Viral RNA Mini Kit – Extracção de DNA de células excretadas na Urina.....	52
2.2.	Método UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit - Extracção de DNA de células excretadas na Urina.....	56
2.3.	Avaliação da integridade do DNA	56
3.	ALTERAÇÕES GENÓMICAS DETECTADAS PELA TÉCNICA DE MLPA.....	59
3.1.	Análise por MLPA de DNA extraído de biópsias tumorais	59
3.1.1.	Cromossoma 3 – Genes <i>FHIT</i> e <i>EPHA3</i>	61
3.1.2.	Cromossoma 4 – Gene <i>FGFR3</i>	62
3.1.3.	Cromossoma 7 – Gene <i>CLIP2</i>	63
3.1.4.	Cromossoma 9 – Genes <i>CDKN2A</i> e <i>CDKN2B</i>	63
3.1.5.	Cromossoma 17 – Genes <i>AKAP10</i> , <i>USP22</i> , <i>NOS2</i> , <i>ERBB2</i> e <i>WSB1</i>	64
3.1.6.	Outras regiões relevantes	65
3.2.	Análise por MLPA de amostras de DNA extraído de células da bexiga excretadas na urina.....	65
3.3.	Comparação dos resultado obtidos para o DNA extraído de biópsias tumorais e de urina	67
4.	ALTERAÇÕES GENÉTICAS E DO PERFIL DE METILAÇÃO DETECTADAS PELA TÉCNICA DE MS-MLPA.....	70
4.1.	Análise dos resultados obtidos por MS-MLPA – Número de cópias.....	70
4.1.1.	Cromossoma 17 – Gene <i>TP53</i>	72
4.2.	Análise dos resultados obtidos por MS-MLPA - Metilação	73
4.2.1.	Cromossoma 2 – Gene <i>MSH6</i>	74
4.2.2.	Cromossoma 9 – Gene <i>PAX5</i>	75
4.2.3.	Cromossoma 10 – Gene <i>KLLN</i>	76
5.	ALTERAÇÕES GENÓMICAS DETECTADAS PELA TÉCNICA DE ACGH.....	76
5.1.	Análise por aCGH de DNA extraído de biópsias tumorais	76
5.1.1.	Discussão dos genes e circuitos de carcinogénese do cancro da bexiga	87
5.2.	Comparação dos resultados obtidos por aCGH e os resultados obtidos por MLPA e MS-MLPA.....	89
6.	OPTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS E SUB-CULTURAS	93
6.1.	Estabelecimento de culturas celulares primárias.....	93
6.2.	Estabelecimento de sub-culturas	95

7. ESTUDO POR FISH DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CANCRO DA BEXIGA.....	97
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	103
1. CONCLUSÕES DO ESTUDO.....	103
2. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	104
3. PERSPECTIVAS FUTURAS	105
CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
CAPÍTULO VII - ANEXOS.....	127

Lista de figuras

Figura 1: Esquematização das diferentes camadas celulares constituintes da bexiga. (Adaptado de ⁶).....	1
Figura 2: Gráfico representativo dos custos relativos aos cuidados em diferentes fases de desenvolvimento do cancro da bexiga em 2010 e a perspectiva para 2020 (Adaptado de ¹⁵).	3
Figura 3: Representação esquemática da taxa de incidência do CB no Mundo em 2008, para ambos os sexos, por 100 000 habitantes. (Adaptado de ²²).....	4
Figura 4: Representação esquemática da taxa de mortalidade do CB no Mundo em 2008, para ambos os sexos, por 100 000 habitantes. (Adaptado de ²²).....	4
Figura 5: Representação esquemática dos diferentes estadios do carcinoma da bexiga. Adaptado de ⁹).....	9
Figura 6: Representação esquemática da correspondência entre a classificação da OMS 1973 e a classificação da OMS/ISUP 2004 (Adaptado de ⁵⁴).	11
Figura 7: CCT detectado pela realização de uma urografia intravenosa. (Proveniente de ⁶⁰).....	12
Figura 8: Imagem de uma recorrência de um CCT captada pela realização de uma cistoscopia. (Proveniente de ⁶⁶).....	13
Figura 9: Células observadas ao microscópio de fluorescência com marcações resultantes da realização do teste UroVysion®.....	15
Figura 10: Representação esquemática dos seis processos biológicos essenciais ao desenvolvimento de uma neoplasia, descritos no ano 2000. (Adaptado de ⁷⁸).....	18
Figura 11: Representação esquemática das etapas do procedimento experimental da técnica de MLPA. a) Desnaturação e hibridização do DNA; b) Reacção de ligação dos dois oligonucleóticos hibridizados em posições adjacentes; c) Reacção de PCR utilizando dois <i>primers</i> universais, X e Y; d) Análise de fragmentos. (Adaptado de ¹⁰¹).....	26
Figura 12: Representação esquemática das etapas do procedimento experimental da técnica de MS-MLPA. a) Desnaturação e hibridização do DNA seguida de divisão do produto de reacção; b) A um dos produtos de reacção adiciona-se a ligase (reacção de ligação) e no outro produto de reacção adiciona-se a ligase e a endonuclease (reacção de ligação e digestão); c) Reacção de PCR utilizando dois <i>primers</i> universais, X e Y; d) Análise de fragmentos. (Adaptado de ¹⁰³).....	28

- Figura 13:** Representação esquemática do procedimento experimental da técnica de aCGH. (Proveniente de: Laboratório de Citogenética e Genómica, FMUC, 2013)...... 29
- Figura 14:** Imagem representativa de um gel de agarose; M – Marcador de pesos moleculares; 1 – DNA fragmentado; 2 – DNA sem fragmentação. (Adaptado de ¹¹⁰).. 38
- Figura 15:** Representação dos genes estudados pelas técnicas de MLPA e MS-MLPA e as suas localizações cromossómicas. A preto estão representados os genes em que apenas foi avaliado o número de cópias. A azul estão representados os genes que, para além do estudo do número de cópias, foi também avaliado o estado de metilação. 43
- Figura 16:** Electroferogramas obtidos pela realização da técnica de MLPA em amostras de DNA extraído de células da bexiga excretadas na urina. (UT – Urina Teste)..... 54
- Figura 17:** Imagem referente ao gel de agarose realizado para avaliação da integridade das amostras consideradas no processo de optimização do processo de extracção de DNA de células da bexiga excretadas na urina. A seta a preto indica a marcação de DNA existente na amostra. (M – Marcador de peso molecular; UT – Urina Teste)..... 57
- Figura 18:** Imagem referente ao gel de agarose realizado para avaliação da integridade de algumas amostras (urinas e biópsias tumorais) incluídas no estudo. (M – Marcador de peso molecular; UDC – Urina Doente Controlo; UD – Urina Doente; BDC – Biópsia Doente Controlo; BD – Biópsia Doente)..... 59
- Figura 19:** Resultados obtidos por MLPA em amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais; A – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); B - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma..... 60
- Figura 20:** Resultados obtidos por MLPA em amostras de DNA extraídas de células excretadas na urina; A – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); B - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma. 66
- Figura 21:** Comparação dos resultados obtidos por MLPA entre amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais e de células excretadas na urina; A – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); B - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma..... 68
- Figura 22:** Resultados obtidos por MS-MLPA (número de cópias) para as amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais; A – Figura representativa das alterações

detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); B - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma.	71
Figura 23: Resultados obtidos por MS-MLPA (metilação) para as amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal). 74	
Figura 24: Representação da frequência de casos que apresentam perda total ou parcial dos braços curto e longo dos cromossomas.....	77
Figura 25: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo Ta,G1. À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.	83
Figura 26: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo T1,G1. À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.	84
Figura 27: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo T1,G2. À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.	85
Figura 28: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo T1,G3 (Doentes 2 e 4) e do tipo T3,G3 (Doente 10). À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.....	86
Figura 29: Representação de casos em que se verifica discordância entre os resultados obtidos por aCGH e MLPA/MS-MLPA (número de cópias). A - Dispersão das sondas de aCGH verificada para o Doente 12 na região do gene <i>PYCARD</i> ; B - Dispersão das sondas de aCGH verificada para o Doente 6 na região do gene <i>WSB1</i> ; C - Dispersão das sondas de aCGH verificada para o Doente 8 na região do gene <i>ATM</i> . Imagem retirada do <i>software Agilent Genomic Workbench v6.5</i>	91
Figura 30: Figura representativa do aspecto das culturas primárias realizadas e que apresentaram um bom crescimento. Cultura referente ao Doente 3.....	95
Figura 31: Células observadas ao microscópio de fluorescência pela realização do teste UroVysion® em células provenientes de cultura primária referente ao Doente 11. A – Célula normal (duas marcações para cada marcação); B – Célula com perda de uma das marcações correspondentes ao cromossoma 17.	98

Lista de tabelas

Tabela 1: Factores de risco associados ao CB.....	5
Tabela 2: Sistema de estadiamento TNM, classificação do cancro da bexiga ⁵³	8
Tabela 3: Grupos de estadiamento do carcinoma da Bexiga (Adaptado de ⁵³).....	9
Tabela 4: Classificação OMS/ISUP das neoplasias da bexiga (Adaptado de ^{20,53}).....	10
Tabela 5: Lista de biomarcadores aprovados pela FDA e em desenvolvimento e suas respectivas sensibilidades e especificidades (Adaptado de ¹⁰).....	14
Tabela 6: Representação de alguns dos genes mais frequentemente alterados no CB, com indicação do tipo de alteração mais comum e das vias moleculares envolvidas (Adaptado de ⁸⁹⁻⁹²).....	21
Tabela 7: Dados clínicos dos doentes incluídos no estudo.....	36
Tabela 8: Representação dos três intervalos de metilação considerados na avaliação dos resultados obtidos neste estudo.....	41
Tabela 9: Caracterização dos doentes com CB incluídos no estudo	51
Tabela 10: Valores referentes à concentração e pureza do DNA obtidos pela aplicação dos métodos de extracção de DNA utilizados.	52
Tabela 11: Representação dos valores de concentração de DNA e dos rácios de pureza obtidos para as algumas amostras consideradas no estudo.....	59
Tabela 12: Genes que apresentaram relevância estatística pela realização de uma análise de kappa de Cohen entre os pares concordante da biópsia tumoral e da urina. .	69
Tabela 13: Representação dos diferentes circuitos, descritos e sugeridos, associados ao CB com indicação das alterações que os caracterizam ⁸²	87
Tabela 14: Resultados obtidos pela realização da técnica de FISH em células resultantes da cultura primária referente ao Doente 11.	98

Lista de anexos

Anexo I: Protocolo de extracção de DNA de biópsias tumorais e de controlos pelo método <i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).....	127
Anexo II: Protocolo de Extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina pelo método <i>QIAamp® Viral RNA Mini Kit</i> (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).	129
Anexo III: Protocolo de Extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina pelo método <i>UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit</i> (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, California).	131
Anexo IV: Designação e localização dos genes estudados pelas técnicas de MLPA e MS-MLPA	133
Anexo V: Representação geral dos resultados obtidos para as técnicas de MLPA (biópsia tumoral e urina), MS-MLPA (número de cópias) e aCGH	135
Anexo VI: Comunicações em formato de poster relacionadas com este trabalho.....	137

Lista de abreviaturas

- aCGH - *Array-based Comparative Genomic Hybridization*
- BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*
- BTA – *Bladder Tumor Antigen*
- CB – Cancro da Bexiga
- CCE – Carcinoma de Células Escamosas
- CCT - Carcinoma de Células de Transição
- CCU – Carcinoma de Células Uroteliais
- Chr - Cromossoma
- Cis – Carcinoma *in situ*
- CNV's - Variações do Número de Cópias
- CR – Cistectomia Radical
- CRA – *Chromosome Resolution Additive*
- Cy3 – *Cyanine 3*
- Cy5 – *Cyanine 5*
- DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- FBS – Soro Fetal Bovino
- FDA – *United States Food and Drug Administration*
- FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*
- F-12 – *Ham's F12 Nutrient Mixture*
- GST – Genes Supressores Tumorais
- GTG - *Giemsa-Trypsin-Giemsa*
- HBSS – *Hanks Balanced Salt Solution*
- HPV – Vírus do Papiloma Humano
- ISUP – Sociedade Internacional de Patologia Urológica
- MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
- MS-MLPA - *Methylation-specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
- NMP22 – *Nuclear Matrix Protein 22*
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PBS – Tampão Fosfato Salino
- PCR – Reacção de Polimerase em cadeia
- P+S – Penicilina + Estreptomicina

RNA – Ácido Ribonucleico

RTU – Ressecção Transuretral

SSC – *Standard Saline Citrate*

TNM – Tumor, Nódulos, Metástases

Tis – Tumor *in situ*



Capítulo I

Introdução

Capítulo I – Introdução

1. O cancro da bexiga

Os carcinomas de células uroteliais (CCU), também conhecidos como carcinomas de células de transição (CCT), dizem respeito a neoplasias que se desenvolvem no interior do tracto urinário mais concretamente na bexiga, ureteres, uretra ou bacinete¹. Os tumores da bexiga e uretra são considerados tumores do tracto urinário inferior e os tumores dos ureteres e bacinetes são considerados tumores do tracto urinário superior². O cancro da bexiga (CB) corresponde a cerca de 95% dos CCU² sendo assim a neoplasia mais comum do tracto urinário¹⁻³. O urotélio corresponde às primeiras 6 a 7 camadas de células da superfície interna dos órgãos do sistema urinário¹. Cerca de 90-95% dos tumores da bexiga tem origem nessa mesma superfície interna de células da bexiga^{4,5}. Com base em aspectos morfológicos das células, os carcinomas da bexiga podem ainda apresentar-se sob a forma de carcinomas de células escamosas (CCE), (também designado como epidermóide ou espinho-celular) e sob a forma de adenocarcinomas, entre outras^{5,6}. Nos países ocidentais, os CCE correspondem a apenas 3 a 6% dos casos de tumores da bexiga, enquanto que menos de 2% dos casos correspondem a adenocarcinomas^{5,7,8}. As restantes formas histológicas são muito raras^{5,8}.

Os tumores da bexiga podem ainda ser classificados como não invasivos (superficiais) ou invasivos. Os tumores superficiais são maioritariamente do tipo papilar desenvolvendo-se a partir das camadas superficiais da bexiga (urotélio e lâmina própria – Figura 1), sem invadir o tecido muscular, para o interior da bexiga⁹, permanecendo

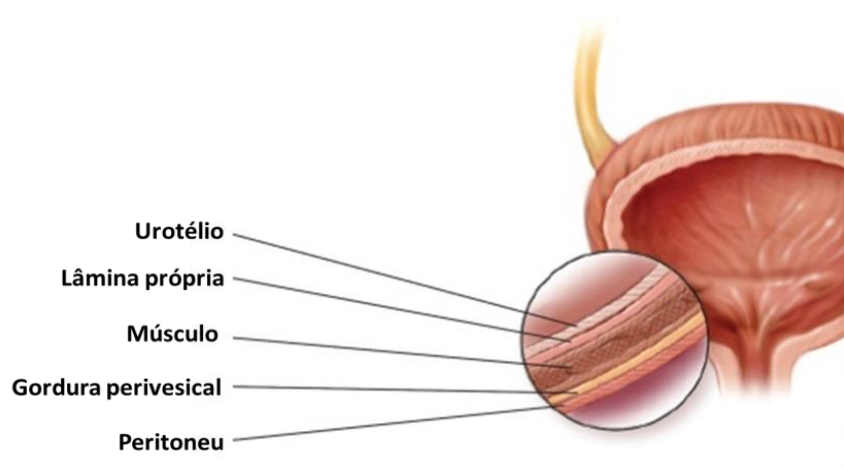


Figura 1: Esquemática das diferentes camadas celulares constituintes da bexiga. (Adaptado de ⁶)

assim em contacto directo com a urina. Cerca de 75-85% dos carcinomas da bexiga manifestam-se ao nível da mucosa ou sub-mucosa, ou seja esta neoplasia manifesta-se essencialmente sob a forma não invasiva³. Este tipo de tumores apresenta uma baixa capacidade de progressão para formas neoplásicas mais agressivas, contudo as taxas de recidiva são bastante elevadas⁹. Aproximadamente 50 a 80% dos tumores superficiais irão efectivamente apresentar recidivas e cerca de 10-15% irão progredir para formas neoplásicas mais agressivas, num período de cinco anos^{4,10,11}. Os tumores invasivos são essencialmente planos, desenvolvendo-se para o interior das diferentes camadas celulares da bexiga. Estes tumores alcançam as camadas musculares e, em tumores mais avançados, poderão até alcançar órgãos vizinhos como próstata, útero, cavidade abdominal, entre outros⁹. Aquando do diagnóstico, cerca de 30% dos doentes possuem tumores musculo-invasivos, sendo que aproximadamente 50% destes já possuem ou irão desenvolver metástases à distância num período de dois anos e 60% deles irão morrer num período de cinco anos, apesar do tratamento^{9,10,12}.

O CB é uma das neoplasias com maiores encargos a nível financeiro, devido não só às elevadas taxas de recidiva e às metodologias de diagnóstico, bem como ao elevado período de seguimento e tratamento destes pacientes^{11,13}. Estima-se que, dependendo do país, os custos relacionados com o CB, entre o diagnóstico e a morte, variam em média, entre \$89,287 e \$202,203 por doente^{11,14}. O elevado período de tratamento e de seguimento de pacientes com história clínica de CB são os principais responsáveis pela maioria dos custos¹¹, de tal forma que na Fase Intermédia, que consiste no período entre o primeiro ano após o diagnóstico da neoplasia e o último ano de vida dos pacientes, os custos associados duplicam em relação aos restantes períodos isoladamente, como é possível observar na Figura 2¹⁵. Para além dos elevados custos já verificados prevê-se que em 2020 os valores referidos anteriormente sofram um aumento de cerca de 21 a 27%, como demonstra a Figura 2¹⁵.

A detecção prematura do cancro da bexiga ou das suas recidivas é considerada a chave para um bom prognóstico e para taxas de sobrevida elevadas, permitindo assim prevenir a formação de metástases e a infiltração para os nódulos linfáticos, evitando estádios avançados da doença em que o prognóstico é muito mais reservado e as taxas de sobrevida são muito diminuídas^{11,16,17}. Assim, o principal objectivo da investigação clínica nesta área, visa a detecção, desenvolvimento e o aperfeiçoamento de biomarcadores com alta sensibilidade e especificidade e que permitam não só detectar prematuramente, de forma não invasiva, tumores da bexiga e suas recidivas mas

também diminuir o impacto socioeconómico desta neoplasia^{10,18}.

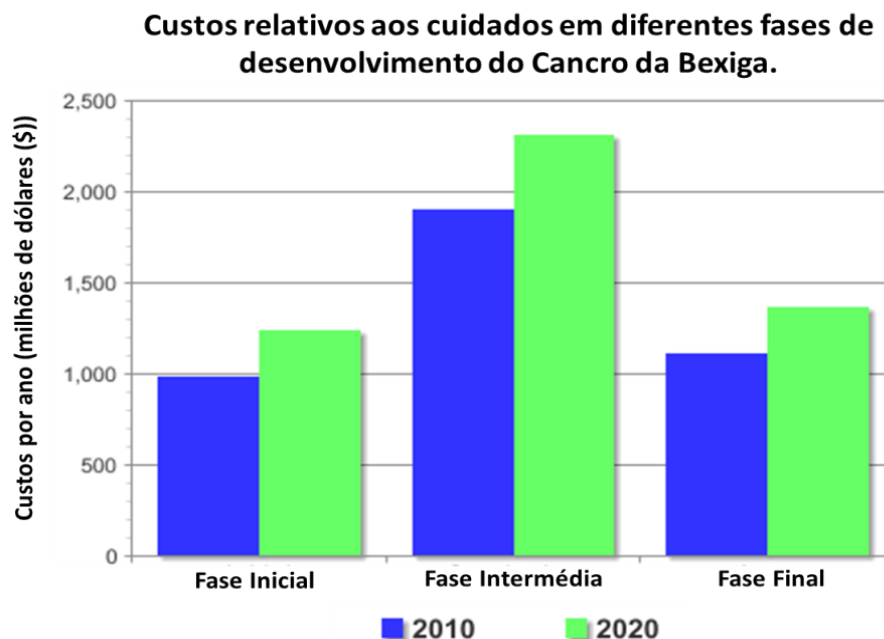


Figura 2: Gráfico representativo dos custos relativos aos cuidados em diferentes fases de desenvolvimento do cancro da bexiga em 2010 e a perspectiva para 2020 (Adaptado de ¹⁵). Fase inicial: custos referentes ao primeiro ano após o diagnóstico; Fase intermédia: custos referentes ao período após o primeiro ano depois do diagnóstico até ao último ano antes da morte do paciente; Fase Final: custos referentes ao último ano de vida do paciente.

2. Taxas de incidência e mortalidade do cancro da bexiga

O CB é uma das neoplasias mais comuns do trato urinário com cerca de 380 000 novos casos diagnosticados na população Mundial em 2008^{2,19-21}. O CB é considerado como a nona neoplasia mais comum a nível Mundial, sendo a sétima no que diz respeito a indivíduos do sexo masculino e a décima oitava em indivíduos do sexo feminino²². As taxas de incidência mais elevadas verificam-se essencialmente na região da Europa, América do Norte, e o norte de África, como se pode observar pela Figura 3^{21,22}. No que diz respeito a Portugal, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008, o CB ocupava a quinta posição na lista dos tumores mais frequentes em indivíduos do sexo masculino e a décima primeira em indivíduos do sexo feminino²². Nesse mesmo ano foram registados 1935 novos casos de CB²².

Quanto à taxa de mortalidade (Figura 4), a neoplasia da bexiga ocupa a décima terceira posição na lista de tumores com maior índice de mortalidade a nível Mundial²². O CB em 2008, segundo dados da OMS, foi a causa de morte de mais de 150 000 indivíduos^{21,22}. O Norte de África e alguns países como a Espanha, a Dinamarca, a

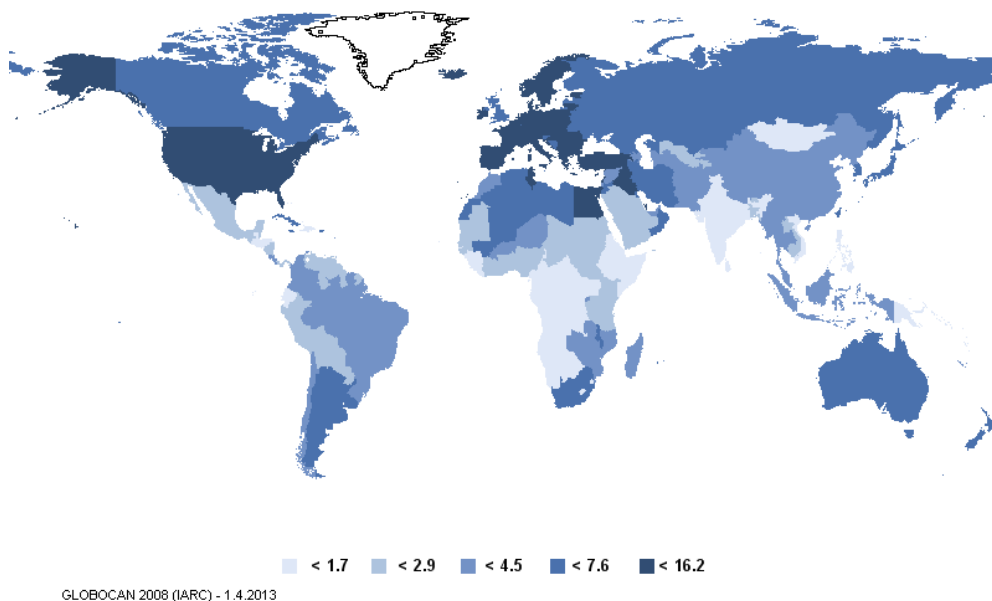


Figura 3: Representação esquemática da taxa de incidência do CB no Mundo em 2008, para ambos os sexos, por 100 000 habitantes. (Adaptado de ²²)

Turquia, a Polónia, o Iraque e o Irão são as regiões que registam maiores taxas de mortalidade (Figura 4)²². Em Portugal, também em 2008, o CB foi responsável pela morte de 721 indivíduos ocupando assim a nona posição na lista dos tumores mais mortíferos²². Na Europa, desde 1990, tem-se verificado um decréscimo na taxa de mortalidade relacionada com este tipo de tumor^{21,23}. Este declínio verificado na Europa pensa-se estar relacionado não só com uma possível redução do número de fumadores, mas também com a diminuição da exposição a agentes ocupacionais reconhecidos como potencialmente carcinogénicos^{21,23}.

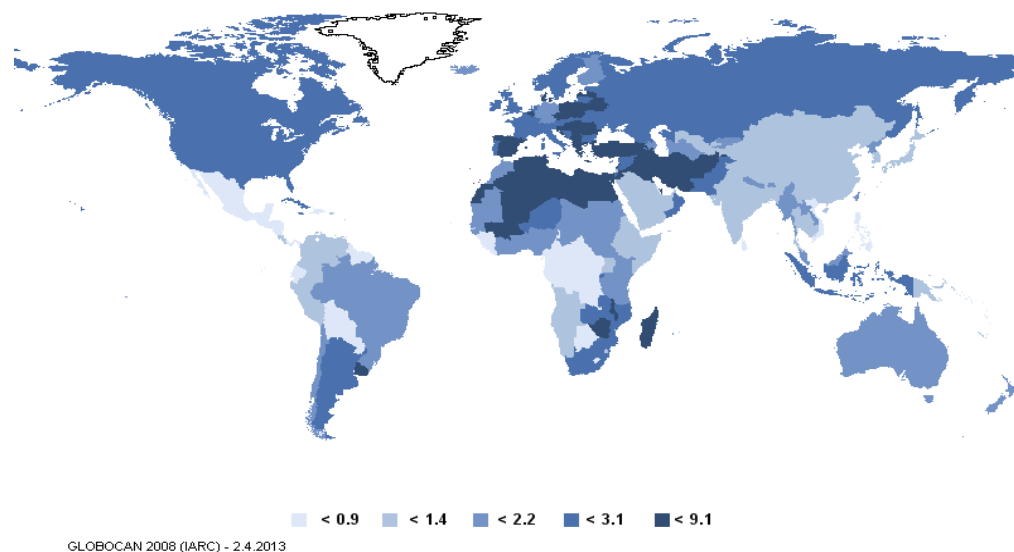


Figura 4: Representação esquemática da taxa de mortalidade do CB no Mundo em 2008, para ambos os sexos, por 100 000 habitantes. (Adaptado de ²²)

Como é possível observar pelos dados referidos anteriormente, as taxas de incidência e mortalidade variam entre as diferentes regiões e países do Mundo (Figura 3 e Figura 4). Este facto deve-se não só a diferenças nos hábitos de higiene, à acessibilidade limitada a metodologias de diagnóstico, tratamento e seguimento de doentes, ao momento do diagnóstico, à reduzida literacia, mas também à existência de diferenças genéticas entre as diferentes etnias²⁴. Estas diferenças genéticas levam a diferentes manifestações fenotípicas da doença²⁴. Estudos realizados com base em indivíduos Americanos, demonstraram que a taxa de incidência desta neoplasia é duas vezes superior em indivíduos de pele branca do que em indivíduos de pele negra. Porém, indivíduos de pele negra apresentam piores prognósticos e taxas de sobrevivência inferiores²⁴.

3. Factores de risco associados ao cancro da bexiga

Existem vários factores de risco que têm sido associados ao CB como representado na Tabela 1.

Tabela 1: Factores de risco associados ao CB.

Factores de Risco	
Sexo	3 a 4 vezes superior no sexo masculino ^{20,25}
Idade	≥ 65 anos ^{20,25}
Hábitos Tabágicos	Risco de desenvolver CB entre 2 a 6 vezes superior em fumadores ^{5,26,27}
Profissão	Profissões de risco: Indústria têxtil, química, de pesticidas, metalúrgicas, cosméticos, bombeiros ^{26,28,29}
Infecções do Tracto Urinário	Associado ao desenvolvimento de CCE ³⁰⁻³²
<i>S. haematobium</i>	Associado a 50% dos casos de CB em países em desenvolvimento ^{21,33,34}
HPV	Observado em 29% dos doentes do sexo masculino ³⁵

O CB afecta cerca de três a quatro vezes mais indivíduos do sexo masculino comparativamente ao sexo feminino^{20,25}. Este facto estará relacionado não só com as diferenças anatómicas entre os dois sexos, os hábitos urinários e factores hormonais, mas também com os hábitos alimentares, a industrialização e o tabaco^{21,25,36,37}. Alguns estudos sugerem a existência de um efeito protector associado aos níveis de estrogénio e

progesterona^{38,39}. A menopausa foi também descrita como estando associada a um aumento do risco de desenvolvimento de cancro da bexiga^{38,40,41}.

O risco de desenvolver CB aumenta com a idade, de tal forma que a idade média de diagnóstico desta neoplasia ronda os 65 anos. Este facto está também relacionado com as elevadas taxas de incidência observadas em países desenvolvidos, visto que é nestes países que a esperança média de vida é mais elevada e, portanto, as populações são mais envelhecidas^{20,25}. A progressiva exposição a carcinogénicos, ao longo da vida, leva a uma acumulação sucessiva de alterações ao nível celular podendo levar ao desenvolvimento da neoplasia, por outro lado sugere-se também a existência de um efeito cumulativo da exposição a agentes carcinogénicos por exemplo, provenientes do tabaco ou associados à profissão de cada indivíduo⁴². Após os 30 anos de idade verifica-se um progressivo declínio das funções fisiológicas^{42,43}, de tal forma que, ao longo dos anos, ocorre não só uma diminuição da dinâmica cardiovascular e da capacidade de resposta imunológica mas também uma perda da função hepática e renal^{42,44,45}. Deste modo, em idades avançadas, a existência de uma metabolização deficitária dos agentes carcinogénicos por parte do fígado, o comprometimento da eficácia de filtração por parte dos rins, bem como a diminuição da frequência urinária (muitas vezes provocada pela diminuição da ingestão de líquidos) leva a uma acumulação excessiva de agentes carcinogénicos na bexiga (urina), podendo desencadear o processo de carcinogénese^{42,44,46}.

Um dos factores de risco para o desenvolvimento de uma neoplasia da bexiga é o consumo de tabaco, sendo este responsável pelo aparecimento de cerca de 30% dos tumores em indivíduos do sexo feminino e 50% a 70% dos tumores em indivíduos do sexo masculino^{5,26}. Deste modo, sugere-se que o risco de desenvolvimento desta neoplasia pode ser cerca de duas a seis vezes superior em indivíduos fumadores do que em indivíduos não fumadores^{5,26,27,47}. O risco de desenvolvimento da neoplasia é directamente proporcional ao número de cigarros e ao tempo (anos) em que o indivíduo é efectivamente fumador. Todavia, a cessação do consumo de tabaco reduz o risco de desenvolvimento de CB²⁸.

A profissão/ocupação de cada indivíduo é também considerada como um dos factores de risco mais importantes para o desenvolvimento de cancro da bexiga, de tal forma que é responsável por cerca de 20% dos casos diagnosticados^{20,28}. A β -naftilamina, 4-aminobifenil e a benzidina são aminas aromáticas com potencial carcinogénico e que são frequentemente associadas ao desenvolvimento de tumores da

bexiga^{28,29,33}. Estes compostos são vulgarmente encontrados não só na indústria têxtil, química, de pesticidas mas também em tintas, produtos cosméticos, cigarros, metais, emissões gasosas de veículos, entre outros^{26,28,29}.

O processo inflamatório desempenha um papel importante no desenvolvimento tumoral⁴⁸. Infecções do tracto urinário estão frequentemente associadas ao desenvolvimento de CCE^{5,30-32}. O processo inflamatório provocado por *S. haematobium* é considerado o principal factor de risco de desenvolvimento de cancro da bexiga em países em desenvolvimento, principalmente em África e países do Médio Oriente, sendo responsável por cerca de 50% dos casos^{21,32,34}. As infecções causadas por este parasita devem-se essencialmente ao consumo de águas contaminadas^{26,30,31}.

Infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV) estão fortemente associadas ao desenvolvimento de neoplasias da cabeça e pescoço, ânus, vulva, entre outras^{26,49}. Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos de forma a avaliar a associação entre o HPV e o CB^{35,49,50}. Recentemente, um estudo desenvolvido por Barghi et al. (2012) demonstrou que cerca de 29% dos casos de CB estudados (apenas indivíduos do sexo masculino) eram portadores de infecção por HPV contudo, não foi descrita uma associação directa³⁵.

4. Classificação anatomo-patológica do cancro da bexiga

O CB é classificado segundo dois critérios: o estadio e o grau de desenvolvimento do tumor⁵. O estadio de um tumor diz respeito à caracterização do mesmo quanto à sua extensão e localização fornecendo ao clínico informação essencial para a determinação do tratamento bem como para a avaliação do prognóstico do paciente^{51,52}. O sistema TNM (*Tumor, Nódulos, Metástases*) é o sistema de classificação mais utilizado para o estadiamento tumoral, permitindo assim a existência de uma linguagem padrão entre os clínicos. Este sistema de estadiamento permite avaliar a extensão do tumor primário (T), o envolvimento dos nódulos linfáticos (N) e a existência de metástases à distância (M)^{51,52}, como demonstrado na Tabela 2⁵³.

O estadio de um tumor pode ser dividido em três grupos, o estadiamento clínico, o estadiamento patológico e o re-estadiamento^{51,52}. O estadiamento clínico corresponde à avaliação tumoral com base em exames físicos, testes imagiológicos ou pela avaliação de biópsias da área afectada e é utilizado para a selecção da terapia primária. O estadiamento patológico (pTNM) é realizado após a avaliação anatómica de uma peça

cirúrgica, tendo em consideração o estadiamento clínico. Este nível de estadiamento é muito importante para a adopção da terapêutica bem como na determinação do prognóstico de cada paciente. O re-estadiamento é realizado em casos em que, mesmo após a realização de procedimentos terapêuticos, se verifica o ressurgimento tumoral^{51,52}. A combinação dos diferentes parâmetros de avaliação do sistema pTNM, como esquematizado na Tabela 3⁵³, permite a criação de grupos de estadiamento que são utilizados de forma a permitir uma avaliação mais cuidada das decisões terapêuticas e da avaliação do prognóstico para cada paciente^{51,52}.

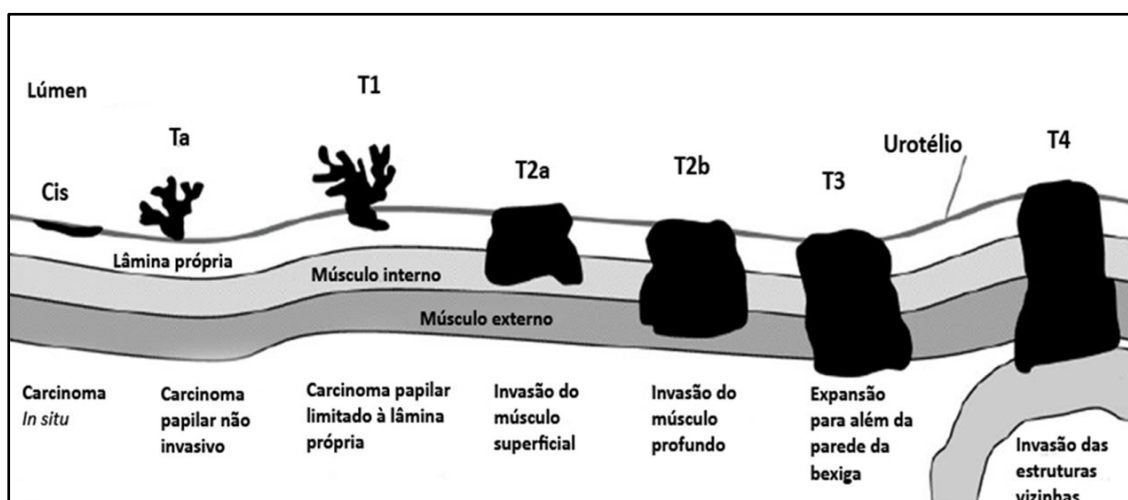
Tabela 2: Sistema de estadiamento TNM, classificação do cancro da bexiga⁵³.

T – Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	O tumor invade o córion da mucosa
T2	O tumor invade o músculo
T2a	O tumor invade a metade interna do músculo
T2b	O tumor invade a metade externa do músculo
T3	O tumor invade o tecido peri-vesical
T3a	O tumor invade o tecido peri-vesical de forma microscópica
T3b	O tumor invade o tecido peri-vesical de forma macroscópica
T4	O tumor invade qualquer um dos órgãos vizinhos: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal
T4a	O tumor invade a próstata, útero ou vagina
T4b	O tumor invade a parede abdominal
N – Gânglios linfáticos regionais	
NX	Os gânglios linfáticos regionais não podem ser avaliados
N0	Gânglios linfáticos regionais sem metástases
N1	Metástases num único gânglio linfático com 2 cm ou menos de maior dimensão
N2	Metástases num único gânglio linfático com mais de 2 cm e menos de 5 cm de maior dimensão ou em múltiplos gânglios linfáticos, nenhum com mais de 5 cm
N3	Metástases num gânglio linfático com mais de 5 cm de maior dimensão
M – Metástases à distância	
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Sem metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Tabela 3: Grupos de estadiamento do carcinoma da Bexiga (Adaptado de ⁵³).

Grupos de Estadiamento			
Estadio 0a	pTa	pN0	M0
Estadio 0is	pTis	pN0	M0
Estadio I	pT1	pN0	M0
Estadio II	pT2a	pN0	M0
	pT2b	pN0	M0
Estadio III	pT3a	pN0	M0
	pT3b	pN0	M0
	pT4a	pN0	M0
Estadio IV	pT4b	pN0	M0
	Qualquer T	pN1	M0
	Qualquer T	pN2	M0
	Qualquer T	pN3	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

A maioria dos tumores da bexiga é do tipo superficial sendo que se manifestam essencialmente ao nível da mucosa (Ta e Tis) ou sub-mucosa (T1). Apesar destes tumores apresentarem um prognóstico relativamente favorável (principalmente os Ta), estes apresentam uma elevada taxa de recidiva e podem ser multifocais o que leva a que seja necessária uma vigilância permanente dos pacientes com este tipo de neoplasias⁹. Os tumores do tipo T2, T3 e T4 são considerados invasivos visto que apresentam invasão do tecido muscular da bexiga⁹. Os tumores do tipo T4 apresentam também extensão para os órgãos e regiões envolventes à bexiga como útero, próstata, vagina, parede pélvica ou parede abdominal, como representado esquematicamente na Figura 5⁹.

**Figura 5:** Representação esquemática dos diferentes estágios do carcinoma da bexiga. Adaptado de ⁹)

Quanto ao grau tumoral podem ser utilizados dois tipos de classificação, a classificação definida pela OMS em 1973 ou a classificação definida conjuntamente pela OMS com a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (OMS/ISUP) em 2004^{20,54,55}. O Grau de um tumor, com base na classificação da OMS em 1973, avalia o nível de diferenciação tumoral e divide-se em três subgrupos essenciais; G1, G2 e G3^{20,54,55} em que tumores de grau 1 (G1) correspondem a tumores de elevado nível de diferenciação, os tumores de grau 2 (G2) correspondem a tumores moderadamente diferenciados e os tumores de grau 3 (G3) correspondem a tumores de baixo nível de diferenciação^{3,55}. Contudo, a utilização desta classificação foi alvo de grande controvérsia devido à dificuldade de interpretação dos limites entre os graus G1/G2 e G2/G3^{54,55}. Assim, em 2004 foi aprovada pela OMS/ISUP uma nova classificação que tem por base uma avaliação citológica e histológica detalhada permitindo uma classificação pormenorizada de cada tumor^{54,55}. O sistema de classificação da OMS/ISUP permite não só classificar alterações neoplásicas mas também alterações benignas e pré-neoplásicas, como nos mostra a Tabela 4²⁰. Actualmente, os dois sistemas de avaliação do grau de um tumor são utilizados em simultâneo apesar de não haver uma associação directa entre cada nível de classificação³, como nos mostra a Figura 6⁵⁴.

Tabela 4: Classificação OMS/ISUP das neoplasias da bexiga (Adaptado de ^{20,53}).

Normal
- Normal
Hiperplasia
- Hiperplasia plana
- Hiperplasia papilar
Lesões planas com atípia
- Atípia reactiva (inflamatória)
- Displasia
- Carcinoma <i>in situ</i>
Neoplasias papilares
- Papiloma
- Neoplasia papilar de baixo potencial maligno
- Carcinoma papilar de baixo grau
- Carcinoma papilar de alto grau
Neoplasias invasivas
- que invadem o córion/lamina própria
- que invadem a muscular própria (músculo destrutor)

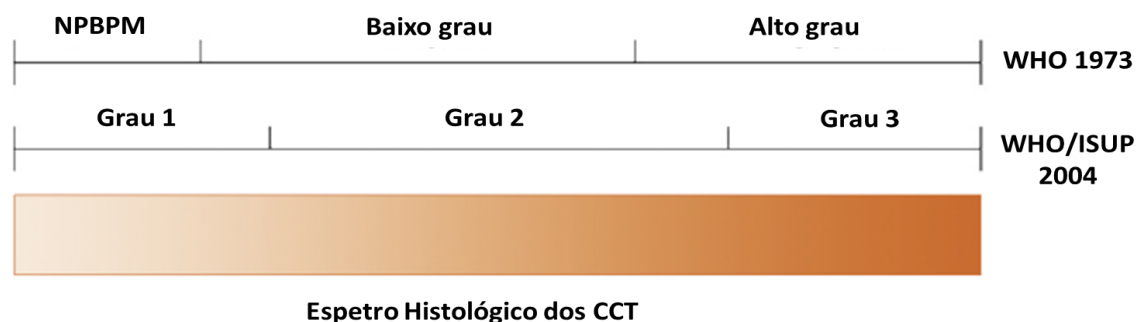


Figura 6: Representação esquemática da correspondência entre a classificação da OMS 1973 e a classificação da OMS/ISUP 2004 (Adaptado de ⁵⁴).

5. Apresentação clínica do cancro da bexiga

O CB apresenta-se, em muitos casos, sob a forma assintomática, de tal forma que o alerta para a possível existência de uma neoplasia deste tipo surge, muito frequentemente, após a realização de exames de rotina^{56,57}. Porém, o sintoma mais frequente em pacientes com CB é a hematuria^{3,57} que é observada em cerca de 85% dos pacientes com CB podendo ser classificada consoante o seu grau de manifestação em microhematuria ou macrohematuria^{5,20}. A intensidade de manifestação da hematuria não está directamente relacionada com a agressividade do tumor. Apesar disso, o rastreio da presença da mesma na população em geral assume-se como um importante auxílio na detecção de tumores de alto grau antes destes se tornarem musculo-invasivos. Este rastreio torna-se, assim um auxílio na detecção do CB em estadios iniciais de desenvolvimento^{57,58}.

Existem também outros sinais e sintomas como a disúria, a urgência urinária, obstrução da uretra, a sensação de irritabilidade da bexiga e a existência de infecções urinárias frequentes que podem alertar para a existência de uma neoplasia deste tipo^{5,20}. A sensação de irritabilidade da bexiga, a frequência urinária e a disúria estão fortemente associados a CIS ou a tumores invasivos, porém quando associados à presença de hematuria podem ser indicativos da expansão do tumor para a uretra na região da próstata²⁰.

Existem ainda alguns sinais e sintomas que se manifestam com menos frequência, como por exemplo a existência de uma dor lateral causada pela obstrução da uretra ou o desenvolvimento de uma massa pélvica detectável por palpação²⁰. Muito raramente podem ainda manifestar-se alguns sintomas como a perda de peso e dores abdominais ou ósseas associadas ao desenvolvimento de metastização²⁰.

6. Metodologias de diagnóstico do cancro da bexiga

Um dos principais desafios para a comunidade científica, na área do CB, passa pelo diagnóstico precoce e o seguimento de pacientes com esta neoplasia¹⁰. O diagnóstico precoce e o seguimento destes pacientes assumem a sua importância devido às elevadas taxas de incidência, recorrência, progressão tumoral bem como ao elevado risco de morbilidade associados a este tipo de tumores^{9,10}. A detecção precoce destes tumores bem como das suas recidivas são considerados pontos fulcrais para a aquisição de um prognóstico favorável⁵⁹. O diagnóstico precoce está fortemente relacionado com a redução da taxa de mortalidade associada a esta neoplasia¹⁰.

Actualmente, existem várias metodologias de diagnóstico do CB, contudo todas elas apresentam fragilidades. O diagnóstico e monitorização de neoplasias da bexiga são realizados com base na combinação de diversos métodos, aumentando assim a sensibilidade e especificidade do diagnóstico⁵⁷. As metodologias de diagnóstico mais utilizadas na detecção de tumores da bexiga são: técnicas de imagem, citologia urinária, cistoscopia e algumas metodologias de diagnóstico molecular^{3,20,59}.

6.1. Técnicas de imagem

As técnicas de imagem permitem uma visualização geral das diferentes regiões do tracto urinário, sendo as mais utilizadas a urografia intravenosa, a tomografia computadorizada e a ecografia transabdominal³. Estas técnicas apresentam diferentes especificidades na detecção de tumores nas diferentes regiões do tracto urinário^{3,20,59}. Contudo, todas as técnicas de imagem aqui referidas apresentam fragilidades essencialmente na detecção de Cis³. A título exemplificativo, a Figura 7 mostra-nos a presença de um carcinoma de células de transição no interior da bexiga, detectado pela realização de uma urografia intravenosa⁶⁰.

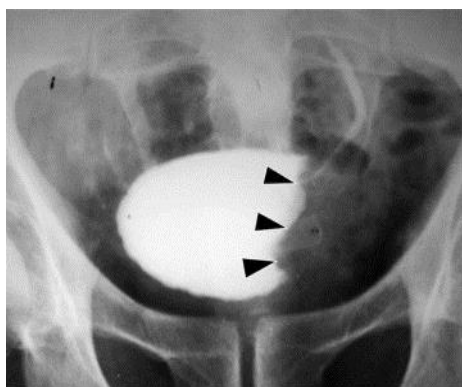


Figura 7: CCT detectado pela realização de uma urografia intravenosa. (Proveniente de ⁶⁰)

6.2. Citologia urinária

A citologia urinária consiste na observação ao microscópio de células libertadas na urina, de forma a detectar alterações morfológicas e identificar a presença de células cancerígenas⁶¹. A citologia urinária é importante na detecção e monitorização de neoplasias de elevado grau^{59,61,62}. As células provenientes de neoplasias de baixo grau ainda não apresentam muitas das características associadas à malignidade, como a condensação da cromatina ou nucléolos de tamanho elevado. Assim, um resultado negativo não exclui a presença de um tumor de baixo grau^{3,61}. Infecções urinárias podem também dificultar/prejudicar o resultado final³. Deste modo, utilizar a citologia urinária para detectar ou excluir um CB pode ser problemático⁶³. A sensibilidade desta técnica pode variar de 40 a 76% dependendo dos estudos em que variam o número de amostras de urina analisadas, do grau e do estadio de desenvolvimento do tumor⁶⁴.

6.3. Cistoscopia

A cistoscopia apresenta uma extrema importância no diagnóstico do CB. Trata-se de uma metodologia de diagnóstico que permite a observação do interior do tracto urinário inferior, como é possível observar pela Figura 8⁶⁴⁻⁶⁶. Com esta metodologia é possível recolher informações como o tamanho, a localização, o número e a aparência do tumor, bem como uma descrição detalhada das alterações existentes na mucosa^{3,20}. Actualmente, segundo as normas da Associação Europeia de Urologia, este teste não pode ser substituído por nenhum outro método de carácter não invasivo e é recomendado a todos os pacientes com sintomas sugestivos da presença desta neoplasia³. Esta metodologia permite a detecção de tumores invasivos e não invasivos,



Figura 8: Imagem de uma recorrência de um CCT captada pela realização de uma cistoscopia. (Proveniente de ⁶⁶)

no entanto apresenta fragilidades na detecção de tumores altamente diferenciados^{3,57}. A cistoscopia é utilizada igualmente na monitorização de pacientes. Porém, este é um método de diagnóstico extremamente invasivo, doloroso e dispendioso^{11,67}.

6.4. Diagnóstico molecular

Actualmente, também já estão disponíveis algumas metodologias de diagnóstico com base em biomarcadores. O teste UroVysion® e o NMP22 *test kit* (Tabela 5) são exemplos de testes de diagnóstico molecular que já foram aprovados pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) e que podem ser utilizados na prática clínica¹⁰.

Tabela 5: Lista de biomarcadores aprovados pela FDA e em desenvolvimento e suas respectivas sensibilidades e especificidades (Adaptado de ¹⁰).

	Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Aprovados pela FDA	UroVysion®	74 - 100	65 - 86
	NMP22	47 - 100	60 - 90
	BTA <i>stat</i>	57 - 83	60 - 92
	ImmunoCyt	50 - 100	69 - 79
Em Investigação	Ácido hialurónico	92	93
	BLCA-1; BLCA-4	80 - 96	87 - 95
	Telomerase	7 - 100	24 - 90
	Survivina	64	93

BTA – *Bladder Tumor Antigen*; NMP22 – *Nuclear Matrix Protein 22*

O teste UroVysion® consiste numa combinação de sondas de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) específicas, de forma a detectar poliploidias para os cromossomas 3, 7 e 17 e deleções do *locus* 9p21^{68,69}. Alterações do número de cópias dos cromossomas 3, 7, 9 e 17 estão frequentemente associadas a esta neoplasia^{10,69}. O *locus* 9p21 engloba a região codificante do gene *CDKN2A* que corresponde a um gene supressor tumoral (GST). Deleções deste gene estão descritas como ocorrendo numa fase inicial do desenvolvimento de tumores da bexiga o que permite um diagnóstico mais específico e sensível^{13,70}. Este teste apresenta uma sensibilidade e especificidade entre 74 a 100% e 65 a 86% respectivamente¹⁰. O teste UroVysion® permite a detecção de tumores invasivos e não invasivos e não sofre alterações com a existência de infecções do trato urinário⁶³.

A Figura 9 mostra-nos dois exemplos de células observadas ao microscópio resultantes da aplicação do teste UroVysion®. Na Figura 9A é possível observar uma célula aparentemente normal, visto que apresenta dois sinais de fluorescência para cada região estudada. A Figura 9B mostra-nos uma célula anormal visto que possui múltiplos sinais de fluorescência para os cromossomas 3, 7 e 17 e para o *locus* 9p21. Contudo, a interpretação dos resultados em células com múltiplos sinais pode ser extremamente difícil. Os critérios utilizados para a determinação de um resultado positivo não são perfeitamente claros, o que leva à possibilidade de ocorrência de falsos positivos e falsos negativos^{10,68}. Outra desvantagem da técnica é o estudo de apenas quatro regiões do genoma^{68,71}. As sondas utilizadas para os cromossomas 3, 7 e 17 são sondas centroméricas, não permitindo uma avaliação sobre possíveis alterações no braço longo e curto destes cromossomas. O teste UroVysion® é também uma metodologia laboriosa e com elevados custos⁷¹.

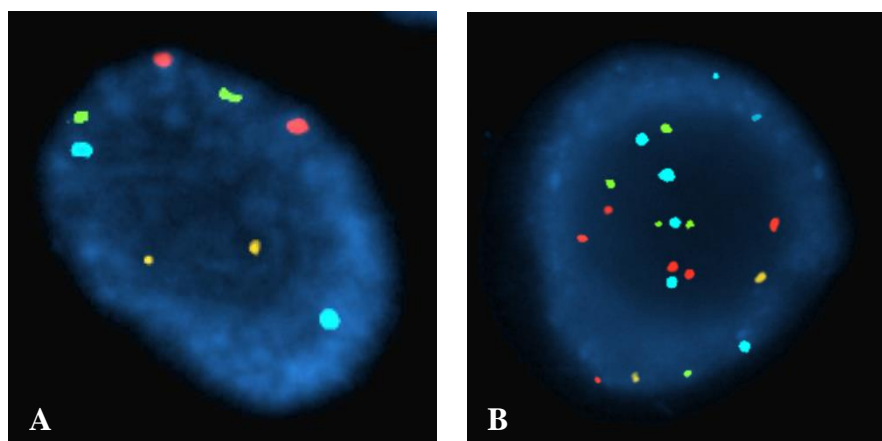


Figura 9: Células observadas ao microscópio de fluorescência com marcações resultantes da realização do teste UroVysion®.

Legenda: Marcações: **Cromossoma 3 – vermelho;** **Cromossoma 7 – verde;** **Cromossoma 17 – azul;** **Locus 9p21 – amarelo;** **A)** Observação ao microscópio de uma célula normal – duas marcações para cada região estudada; **B)** Observação ao microscópio de uma célula anormal - marcações múltiplas (6 marcações para o chr 3; 5 marcações para o chr 7; 7 marcações para o chr 17; 2 marcações para o *locus* 9p21). (Proveniente de: Laboratório de Citogenética e Genómica, FMUC, 2012)

O teste NMP22 avalia de forma qualitativa a presença de uma proteína da matriz nuclear (*Nuclear matrix protein 22*) na urina⁷². Esta proteína intervém no processo de divisão mitótica, sendo libertada para o meio extracelular aquando da ocorrência de fenómenos apoptóticos⁷². Estima-se que, esta proteína apresenta uma concentração cerca de 20 a 80 vezes superior em urinas de doentes com CB do que em doentes sem esta neoplasia⁷². No entanto as taxas de falsos positivos associados a este teste são elevadas⁷³

Até à data, existem vários estudos desenvolvidos com o objectivo de identificar novos biomarcadores cada vez mais sensíveis e específicos (Tabela 5)^{10,13,74}. A combinação entre os diferentes testes surge como um importante auxílio não só no diagnóstico do CB mas também no rastreio, seguimento e avaliação do prognóstico de pacientes¹⁰. Apesar de tudo, o biomarcador ideal para o diagnóstico e seguimento de pacientes com CB ainda não foi identificado. Tal como referido anteriormente, a cistoscopia não pode ser substituída por nenhum teste de carácter não invasivo^{3,10}. Assim, estas metodologias assumem um carácter complementar à cistoscopia e nunca de substituição^{3,10}. O investimento no estudo de biomarcadores envolvidos no processo de carcinogénese da bexiga assume-se cada vez mais como uma área de interesse entre a comunidade científica.

Um biomarcador ideal para o CB deverá ter a capacidade de identificar precocemente recidivas de tumores, antever a progressão tumoral mas também ter a capacidade de substituir ou complementar a cistoscopia na monitorização de pacientes¹⁰. Por outro lado, o teste de monitorização ideal deverá ter características como: não invasivo, objectivo, de fácil e rápida execução e interpretação, altamente específico, sensível e economicamente viável¹⁰.

7. Tratamento do cancro da bexiga

O tratamento do CB é realizado com base na combinação de terapias de forma a aumentar a eficácia do tratamento^{3,75}. As metodologias mais utilizadas para o tratamento desta neoplasia são a ressecção transuretral (RTU) e a cistectomia radical (CR), que na grande maioria das vezes são combinadas com quimioterapia e/ou radioterapia^{3,75}.

A principal dificuldade associada à terapêutica do CB prende-se com a elevada taxa de recidiva⁷⁶. A quimioterapia e a radioterapia frequentemente são utilizadas como metodologias complementares à RTU e à CR de forma a evitar/diminuir a taxa e a velocidade de recidiva destes tumores^{3,75}.

Recentemente, foram identificados alguns novos alvos terapêuticos⁷⁷. Por exemplo, o gene *EGFR* é um receptor tirosina cinase que se apresenta anormalmente activo em vários tumores, incluindo no CB. A expressão aumentada do gene *EGFR* no CB está associada a um mau prognóstico⁷⁷. De forma a ultrapassar esta expressão aumentada deste gene, têm-se testado vários inibidores da tirosina cinase, contudo os resultados não têm sido muito satisfatórios⁷⁷. Outro exemplo é a via *PI3K/AKT/mTOR*

que se encontram em estudo como alvo terapêutico associado ao CB. A via *PI3K/AKT/mTOR* está envolvida na regulação de um elevado número de funções celulares, como por exemplo a angiogénese, a adesão e o crescimento celular, entre outros⁷⁷. Alterações nesta via são frequentes em pacientes com CB, contudo pacientes com alterações deste tipo apresentam baixas taxas de resposta a terapias. Têm sido testados inibidores quer para o gene *PIK3*, *AKT* ou para o *mTOR* sendo que os resultados mais satisfatórios foram alcançados quando se recorreu ao everolimus, inibidor do *mTOR*⁷⁷.

8. A instabilidade genética e as vias moleculares envolvidas no cancro da bexiga

8.1. O cancro e a instabilidade genética

Nas células tumorais verifica-se uma desregulação de vários mecanismos celulares levando assim a uma alteração da sua função e conseqüentemente a perda da arquitectura do tecido em causa⁷⁸. O desenvolvimento de uma neoplasia é considerado um processo complexo e implica a ocorrência de alterações de vários tipos, como por exemplo ao nível genético, epigenético, entre outros^{78,79}.

Têm sido descritos várias características biológicas essenciais para a progressão de uma neoplasia e para a metastização. Entre elas temos: a manutenção da sinalização proliferativa, o silenciamento de supressores de crescimento, a resistência à morte celular, a capacidade de replicação indefinida, a indução da angiogénese e a activação da invasão e metastização (Figura 10)⁷⁸. Assim, as células tumorais ao serem portadoras destas características apresentam vantagens selectivas perante as restantes células^{78,80}. Porém, a aquisição das mesmas não se verifica de forma espontânea, de tal forma que a instabilidade genética e a ocorrência de mutações são consideradas como os principais factores para o desenvolvimento destas características por parte das células^{78,80}.

Na base do processo de carcinogénese está o aumento da sensibilidade a agentes mutagénicos que leva ao aumento da probabilidade de ocorrência de quebras numa ou em várias regiões do genoma que poderão desempenhar funções importantes no controlo da sua estabilidade e integridade⁷⁸. Deste modo, o comprometimento de genes chave neste processo de controlo, como por exemplo ao nível do gene *TP53*, mostra-se fulcral no progresso de desenvolvimento de uma neoplasia⁷⁸.

No que diz respeito ao tipo de mutações mais frequentes no processo de

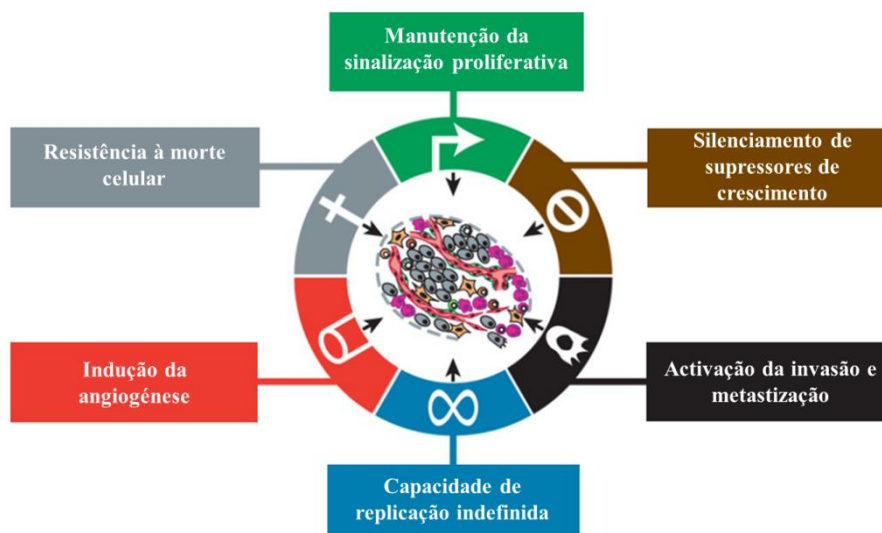


Figura 10: Representação esquemática dos seis processos biológicos essenciais ao desenvolvimento de uma neoplasia, descritos no ano 2000. (Adaptado de ⁷⁸)

carcinogénese, 90,7% resultam em mutações *missense*, 7,6% são do tipo *nonsense* e 1,7% resultam em alterações do local de *splicing*. A ocorrência de uma primeira mutação numa célula somática, confere uma vantagem selectiva à célula⁸⁰. Ao longo do tempo e com o desenrolar de novos ciclos celulares verifica-se a aquisição de novas alterações que irão sucessivamente aumentar a vantagem selectiva em relação às anteriores⁸⁰. Estima-se que, por cada mutação relevante, a vantagem selectiva adquirida é de 0,4%⁸⁰. Deste modo, torna-se possível o desenvolvimento de massas celulares heterogéneas e com capacidade de resistência aos principais mecanismos de controlo⁸⁰.

No processo de carcinogénese a ocorrência de alterações no número de cromossomas (aneuploidia) bem como de deleções, amplificações, inversões e translocações são também muito frequentes^{80,81}. Vários estudos têm sido realizados de forma a identificar genes potenciadores do processo de carcinogénese^{13,82}. Todavia, a identificação de genes discriminatórios tem-se verificado ser de extrema dificuldade. No caso de alterações que envolvam parcialmente ou a totalidade de um cromossoma, a identificação dos genes que conferem a vantagem selectiva às células é extremamente difícil devido ao elevado número de genes envolvidos⁸⁰. A identificação de genes com relevância no processo de carcinogénese mostra-se mais eficiente no caso de translocações, deleções homozigóticas e amplificações⁸⁰. A ocorrência de translocações pode induzir a fusão de dois genes de forma a criar um oncogene, como por exemplo no caso do gene de fusão *BCR-ABL* observado em casos de leucemia mielóide crónica, ou pode levar à inactivação de genes supressores tumorais (GST), por exemplo por quebra da região promotora⁸⁰. Deleções homozigóticas, regra geral, envolvem um reduzido

número de genes que frequentemente são GST. Amplificações em células cancerígenas são mais frequentemente observadas em regiões codificantes de oncogenes que pelo aumento do número de cópias induzem uma sobre-expressão da proteína codificante⁸⁰. Porém, tem sido sugerido que, o processo de carcinogénese em geral envolve cerca de 10 vezes mais genes associados à ocorrência de mutações do que à ocorrência de rearranjos cromossómicos⁸⁰.

Muito recentemente, surgiu um novo conceito para a caracterização da instabilidade genómica designado como Cromotripsis⁸³. Este fenómeno é considerado como um evento catastrófico a nível cromossómico, dado que corresponde à ocorrência de um elevado número de quebras no DNA de um ou vários cromossomas seguido da sua reorganização de forma aleatória⁸³. Deste modo, verifica-se a ocorrência de um elevado número quer de perdas quer de ganhos ao nível dos cromossomas envolvidos^{83,84}. O conceito de cromotripsis é ainda muito recente, todavia existem já alguns estudos que associam este fenómeno ao cancro e também a algumas doenças congénitas^{83,84}. Em relação ao cancro da bexiga, ainda não foi descrita a associação deste recente fenómeno com a neoplasia mas estima-se que o fenómeno de cromotripsis se observa em cerca de 2 a 3% de todos os cancros⁸³.

Alterações epigenéticas como, alterações no padrão de metilação e a modificação de histonas, estão frequentemente associadas à activação e inactivação de regiões específicas da cromatina regulando assim os níveis de expressão proteica^{78,79}. Deste modo, as alterações epigenéticas estão também fortemente relacionadas com o processo de carcinogénese desempenhando uma função essencial na activação e inactivação de oncogenes e GST⁷⁹.

8.2. Genes e vias moleculares com relevância no processo de carcinogénese da bexiga.

Pensa-se que o desenvolvimento e progressão do CB está associado à acumulação de alterações genéticas e cromossómicas que vão ocorrendo ao longo do tempo⁸⁵. Muitos estudos classificam as alterações observadas como não aleatórias, defendendo que os diferentes estadios de desenvolvimento do tumor se caracterizam pela ocorrência de diferentes alterações genéticas e cromossómicas^{82,85}.

Vários estudos têm sido desenvolvidos de forma a detectar alterações cromossómicas verificadas em células tumorais da bexiga e a sua influência no processo

de carcinogénese^{13,18,82}. Porém, ainda não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo para o CB. O desenvolvimento e aperfeiçoamento de metodologias de biologia molecular e genómica, como o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) ou o *Array-based Comparative Genomic Hybridization* (aCGH) têm desempenhado um papel essencial no estudo da instabilidade cromossómica verificada não só no caso do CB mas do cancro em geral^{82,86}. A utilização deste tipo de metodologias possibilitou um considerável aumento do poder de resolução no que diz respeito à capacidade de detecção de rearranjos cromossómicos desequilibrados^{86,87}. As alterações que têm sido mais frequentemente associadas à neoplasia da bexiga são perdas nos cromossomas 3p, 8p, 9p, 9q, 11p, 17p e Y e ganhos nos cromossomas 1q, 3q, 5p, 8q, 11q, 17q e 20q^{5,88}. Contudo, a identificação dos genes que conferem a vantagem selectiva necessária ao desenvolvimento e progressão de neoplasias da bexiga permanece por esclarecer. O elevado tamanho das alterações verificadas bem como o elevado número de genes envolvidos têm-se revelado como os principais factores limitantes dos estudos realizados⁵.

No desenvolvimento e progressão tumoral os proto-oncogenes e os GST desempenham um papel fulcral⁸⁹. Os proto-oncogenes são genes que se apresentam associados ao controlo do ciclo celular, à diferenciação celular e à tradução proteica. Estes genes, ao sofrerem alterações como mutações pontuais, translocações ou amplificações tornam-se incapazes de desempenhar correctamente a sua função. Deste modo, transformam-se em genes com potencial cancerígeno – oncogenes. Os GST são genes que estão na base do controlo dos mecanismos celulares. Porém, no processo de carcinogénese apresentam-se frequentemente inactivados por alterações genéticas e epigenéticas. Actualmente, já estão identificadas alterações em diversos genes com relevância para o processo de carcinogénese da bexiga como representado na Tabela 6. Apresenta-se uma breve caracterização de 6 oncogenes e 10 genes supressores tumorais frequentemente alterados no CB. Apresenta-se também uma breve descrição de alguns dos genes com maior impacto no CB.

Tabela 6: Representação de alguns dos genes mais frequentemente alterados no CB, com indicação do tipo de alteração mais comum e das vias moleculares envolvidas (Adaptado de⁸⁹⁻⁹²).

Gene	Localização	Tipo de alteração	Principais vias envolvidas
Oncogenes			
<i>PIK3CA</i>	3q26	Mutação, amplificação	Crescimento, sobrevivência, proliferação, motilidade e morfologia celular
<i>FGFR3</i>	4p16	Mutação	Controlo do ciclo celular e angiogénese
<i>E2F3</i>	6p22	Amplificação	Proliferação celular
<i>CCND1</i>	11q13	Amplificação	Proliferação celular e transição G1/S
<i>MDM2</i>	12q13	Amplificação	Controlo do ciclo celular e apoptose
<i>ERBB2</i>	17q12	Amplificação	Activação da mitose
Genes Supressores Tumorais			
<i>RARB</i>	3p24.2	Metilação	Diferenciação celular
<i>APC</i>	5q22.2	Metilação	Migração, adesão celular e apoptose
<i>CDKN2A</i>	9p21	DH, mutação, metilação	Proliferação celular
<i>TSC1</i>	9q34	Deleção, Mutação	Crescimento celular
<i>PTEN</i>	10q23	DH, Mutação	Migração celular
<i>MGMT</i>	10q26.3	Metilação	Reparação do DNA
<i>WT1</i>	11p13	Metilação	Diferenciação celular e apoptose
<i>RBI</i>	13q14	Deleção	Transição G0/G1
<i>TP53</i>	17p13	Deleção, Mutação	Proliferação, apoptose e angiogénese
<i>BRCA1</i>	17q21.31	Metilação	Reparação do DNA

(DH: Deleção Homozigótica)

8.2.1. O gene *PIK3CA*

A via molecular da *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) desempenha uma função essencial no crescimento, na proliferação e na sobrevivência celular⁹³. Porém, alterações nesta via têm sido frequentemente associadas a diversos cancros. O proto-oncogene *PIK3CA* (3q26) codifica uma subunidade catalítica da via PI3K e é activado pela ocorrência de mutações pontuais ou amplificações do número de cópias do gene⁹³. Mutações neste gene representam uma das alterações mais frequentes no CB sendo observadas em cerca de 20% dos tumores superficiais⁸⁹. Deste modo, sugere-se que a taxa de mutação ao nível do gene *PIK3CA* esteja relacionada com o estadio e grau do tumor. Os tumores do tipo Ta e T1 de baixo grau são o tipo de tumores que apresentam taxas de mutação mais elevadas. Mutações neste gene são muito raras em tumores invasivos^{89,93}. As mutações mais frequentes encontram-se associadas aos exões 10 e 21

e envolvem os codões E542K, E545K, H1047R e H1047L^{89,93}. As mutações ao nível do codão H1047R são o tipo de mutação mais frequente no cancro em geral, contudo este facto não se verifica para o caso do CB. Em neoplasias da bexiga a maior taxa de mutação do gene *PIK3CA* apresenta-se associada ao codão E545K⁸⁹. Mutações neste codão correspondem a cerca de 52% do total de mutações encontradas neste gene⁸⁹.

8.2.2. O gene *FGFR3*

Nos últimos anos, o gene *FGFR3* (4p16.3) tem sido muito estudado devido às suas potenciais aplicações no diagnóstico do cancro da bexiga⁸⁹. Mutações neste gene estão associadas a tumores de baixo grau e estadio de tal forma que estão presentes em cerca de 70% dos tumores não invasivos Ta, estando ausentes dos CIS e em tumores do tipo T1 a T4 a sua frequência é muito baixa^{67,94}. Assim, mutações ao nível do gene *FGFR3* são consideradas como eventos precursores da origem de tumores papilares de baixo grau⁸⁹. As mutações mais comuns envolvem os exões 7, 10 e 15 e os codões com maior taxa de mutação são: exão 7 – codões S249C e R248C; exão 10 – codões Y375C, G372C e A393E; exão 15 – codões K642E e K652M. Contudo, importa salientar que os codões mais frequentemente mutados são o S249C e o Y375C que correspondem a cerca de 67% e 15% do total das mutações observadas⁸⁹. Mutações neste gene são características apenas de células tumorais, não sendo registadas em células não tumorais⁶⁷. Porém, o cancro do colon, tumores benignos da pele, cancro do colo do útero bem como o cancro da próstata são exemplos de neoplasias em que também se verificam mutações no gene *FGFR3*⁹⁵.

8.2.3. Os genes *CDKN2A* e *CDKN2B*

Alterações no cromossoma 9 estão descritas como sendo as alterações mais comuns e das primeiras a ocorrer no aparecimento de um CB¹³. O gene *CDKN2A* (9p21) codifica duas proteínas supressoras tumorais, a p16^{INK4a} e a p14^{ARF}. A p16^{INK4a} está associada à progressão do ciclo celular e à indução da senescência⁹⁴. A p14^{ARF} está associada à estabilização da proteína p53 que desempenha uma função fulcral no controlo do ciclo celular. O gene *CDKN2A* está associado a elevadas taxas de deleção em casos de CB⁹⁴. Em muitos casos, verifica-se também a perda em simultâneo do gene vizinho, *CDKN2B*, que codifica a proteína p15^{INK4b} que corresponde a um inibidor do ciclo celular⁹⁴. Vários estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de perceber a relação

destes genes com o grau, o estadio de desenvolvimento do tumor bem como a sua capacidade de recorrência e invasão, contudo não há consenso entre os resultados obtidos⁹⁴.

8.2.4. O gene *TSC1*

O gene *TSC1* (9q34) é um controlador do crescimento celular e é um dos dois genes que está directamente relacionado com a síndrome da esclerose tuberosa⁹⁶. Porém, alterações neste gene já estão descritas em casos de CB⁸⁹. Até à data, ainda não foram descritas alterações neste gene associadas a outras neoplasias. Mais de 50% dos tumores da bexiga, de todos os graus e estadios, apresentam perda de heterozigotia de regiões do cromossoma nove sendo que, o gene *TSC1* é considerado uma das regiões críticas⁸⁹. A perda de função deste gene no CB, na grande maioria dos casos, deve-se à ocorrência de mutações pontuais ou deleções envolvendo o gene⁸⁹. Nos últimos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos de forma a compreender a possibilidade de utilização deste gene no diagnóstico, na terapêutica e na avaliação do prognóstico^{89,96}.

8.2.5. Alterações epigenéticas

Alterações epigenéticas, essencialmente ao nível do padrão de metilação de genes, são também frequentemente observadas no CB⁹¹. O processo de metilação consiste na adição de um grupo metilo ao carbono cinco das citosinas, presente nas ilhas na região promotora dos genes, levando a um silenciamento da expressão do gene⁷⁹. Assim, alterações ao nível do padrão de metilação são um importante mecanismo de activação e inactivação de oncogenes e GST. Genes como o *APC*, o *WT1*, o *BRCA1* e o *RARB* são alguns exemplos de genes que se apresentam frequentemente hipermetilados e, consequentemente, silenciados no CB (Tabela 6)^{18,91,92}.

9. A urina como intermediário do diagnóstico do cancro da bexiga

O metabolismo celular gera vários subprodutos que necessitam de ser eliminados da corrente sanguínea. Deste modo, a urina consiste num biofluido produzido nos rins, pela filtração do sangue, e que visa a eliminação dos subprodutos celulares referidos anteriormente. Cerca de 95% da urina é composta por água sendo os restantes 5% constituídos essencialmente por compostos nitrogenados (como a ureia), vitaminas, hormonas, ácidos orgânicos e um elevado número de outros compostos orgânicos⁹⁷.

As células resultantes da esfoliação das camadas celulares superficiais da bexiga são eliminadas na urina. Deste modo, a colheita deste biofluido consiste na única metodologia não invasiva que possibilita a obtenção de células provenientes do interior da bexiga. Porém, a obtenção de células tumorais por intermédio da urina pode não ser fácil. Por exemplo, o nível de esfoliação de tumores de baixo grau é menor do que no caso de tumores de elevado grau^{98,99}. Este facto deve-se às ligações intercelulares em tumores de alto grau serem mais fracas do que em tumores de baixo grau⁹⁸. Por outro lado, doentes com CB têm, frequentemente, hábitos urinários alterados associados a outras patologias como diabetes mellitus, poliúria ou noctúria. Desta forma, estes doentes urinam frequentemente, dificultando a recolha de células neoplásicas na urina em quantidades suficientes⁶⁷. Outra dificuldade inerente à obtenção de DNA em qualidade e concentração necessária prende-se com a própria constituição da urina. Um dos principais componentes da urina é a ureia que é um agente desnaturante da dupla cadeia de DNA. O contacto directo deste agente nitrogenado com as células resultantes da esfoliação da bexiga pode comprometer a integridade do DNA e conseqüentemente da sua possível utilização em testes moleculares. Apesar das dificuldades inerentes à utilização do DNA proveniente de células excretadas na urina, esta assume-se como um biofluido promissor no que diz respeito ao diagnóstico e seguimento de pacientes com CB. A recolha da urina permite, não só o contacto com células provenientes do interior da bexiga de forma não invasiva, mas também torna possível a repetição da amostragem sempre que necessário e a recolha de vários espécimes num período de tempo relativamente curto⁹⁹. Estudos recentes indicam que de facto é possível utilizar DNA de células excretadas na urina, como forma, por exemplo, de estudar padrões de metilação de genes e auxiliar no diagnóstico e seguimento de pacientes com esta neoplasia^{18,67}.

10. Técnicas de biologia molecular e genómica como meios de diagnóstico do cancro da bexiga

Nos últimos anos, muitos avanços têm sido efectuados de forma a desenvolver novas metodologias ou novos biomarcadores capazes de auxiliar no diagnóstico precoce, na avaliação do prognóstico e na adaptação das estratégias terapêuticas^{10,18,82}. Contudo, o desenvolvimento deste tipo de metodologias, cada vez mais sensíveis e específicas, implica a utilização de tecnologia de igual modo avançada. Das novas metodologias salientam-se as técnicas de MLPA, MS-MLPA (*Methylation-specific*

MLPA) e o aCGH que permitem a caracterização do perfil genómico do CB e/ou a identificação de alterações no padrão de metilação neste tipo de tumores.

10.1. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA*

A técnica de MLPA foi descrita pela primeira vez por Schouten e colaboradores em 2002⁸⁶. O MLPA é uma técnica de biologia molecular que possibilita a detecção de alterações do número de cópias e de mutações no DNA genómico¹⁰⁰. Esta técnica permite a utilização de cerca de 45 a 50 sondas específicas para determinadas regiões do DNA, em simultâneo^{86,100}. Cada sonda é formada por dois oligonucleótidos o que confere uma elevada especificidade à técnica. A quantidade de DNA necessária para a execução desta técnica também é considerada como uma vantagem importante visto que apenas requer a utilização de cerca de 20 a 50 ng de DNA⁸⁶.

As principais aplicações desta técnica consistem essencialmente no diagnóstico pré e pós-natal⁸⁶. Porém, recentemente tem vindo a ser utilizada também na caracterização de tumores^{86,100}. No que diz respeito ao diagnóstico pré e pós-natal, o MLPA possibilita o rastreio das aneuploidias mais comuns (cromossomas 13, 18, 21, X e Y) mas também a detecção de algumas síndromes como a síndrome de DiGeorge, Prader-Willi, Angelman entre outras^{86,101}. Quanto à caracterização de tumores por MLPA, já foram desenvolvidos alguns painéis de sondas específicos para alguns tumores, que permitem auxiliar não só no diagnóstico da neoplasia mas também na avaliação do prognóstico e na adaptação da estratégia terapêutica¹⁰⁰.

Relativamente ao procedimento experimental, a técnica de MLPA requer a utilização apenas de um termociclador e de um sistema de electroforese capilar¹⁰⁰. Inicialmente, o DNA é desnaturado e em seguida ocorre a hibridização entre o DNA alvo e as duas sequências oligonucleotídicas de cada sonda (Figura 11 a)). Apenas as sequências oligonucleotídicas que hibridizam em posições adjacentes são unidas por acção de uma ligase (Figura 11 b)) e posteriormente amplificadas numa reacção de PCR (Figura 11 c))⁸⁶. Apesar de cada sequência oligonucleotídica possuir uma sequência para um dos *primers* universais, as que não foram unidas não vão ser amplificadas exponencialmente na reacção de PCR e, desse modo, não irão ser detectadas por electroforese capilar⁸⁶. Estas sondas são identificadas por electroforese capilar devido à diferença de tamanho que apresentam entre si. O tamanho das sondas amplificadas pode variar de 130 a 480 nucleótidos⁸⁶. Esta diferença entre sondas é conferida pela presença

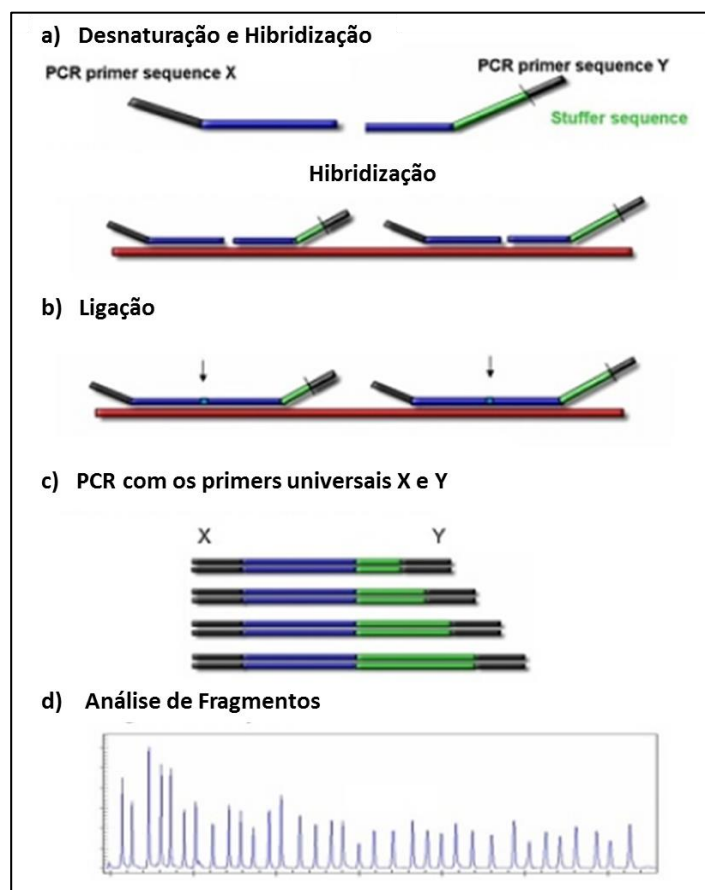


Figura 11: Representação esquemática das etapas do procedimento experimental da técnica de MLPA. **a)** Desnaturação e hibridização do DNA; **b)** Reacção de ligação dos dois oligonucleóticos hibridizados em posições adjacentes; **c)** Reacção de PCR utilizando dois *primers* universais, X e Y; **d)** Análise de fragmentos. (Adaptado de ¹⁰¹)

de uma “*stuffer sequence*” que difere de seis ou nove pares de bases de sonda para sonda ⁸⁶. Para além de permitir a identificação das mesmas, esta diferença de tamanho também permite que apenas se recorra a dois *primers* universais para a reacção de PCR ^{86,100}.

Na reacção de MLPA, não é a sequência de DNA alvo que é amplificada, mas sim as sondas de MLPA que com ela hibridizam ⁸⁶. Deste modo, o número de sondas resultantes da acção da ligase são uma medida directamente proporcional ao número de cópias da sequência de DNA alvo ⁸⁶. Por electroforese capilar é obtido um padrão de picos (electroferograma) (referente ao número de sequências amplificadas para as diferentes sondas utilizadas) (Figura 11 d)) que quando comparado com o padrão de picos obtido para uma amostra controlo, permite identificar alterações do número de cópias do DNA genómico ^{86,100}.

Em suma, a técnica de MLPA é uma metodologia fiável na detecção de alterações desequilibradas, sendo possível obter os resultados num período inferior a 24 horas após

o início do procedimento experimental. A relação custo-benefício da utilização desta técnica tem-se mostrado bastante satisfatória¹⁰⁰.

10.2. Methylation-specific MLPA - MS-MLPA

O MS-MLPA é uma variante do MLPA convencional que permite não só avaliar o número de cópias de sequências de DNA, mas também avaliar o estado de metilação das mesmas. O procedimento experimental é muito semelhante ao do MLPA convencional. Contudo, neste caso é necessário a utilização de uma endonuclease (HhaI) que reconhece locais de restrição na sequência de DNA alvo e é sensível ao estado de metilação do DNA^{100,102}.

Inicialmente o DNA é desnaturado e em seguida ocorre a hibridização entre o DNA alvo e as duas sequências oligonucleotídicas de cada sonda (Figura 12 a)). Após a hibridização, a amostra é dividida em dois tubos^{100,102,103}. Num dos tubos, a amostra é processada como no caso de uma reacção de MLPA convencional, fornecendo informação sobre o número de cópias de cada região a estudar. No outro tubo, a amostra é incubada com a endonuclease HhaI que actua sobre o DNA enquanto as sequências oligonucleotídicas de cada sonda são unidas por acção da ligase (Figura 12 b))^{100,102}. A endonuclease, na ausência de DNA metilado, reconhece o seu local de restrição e induz a quebra da sonda (Figura 12 b)). Desta forma, a sonda quebrada não é amplificada na reacção de PCR e não é detecta por electroforese capilar. Na presença de DNA metilado, o DNA está protegido da acção da endonuclease (Figura 12 b)) e, assim, a sonda é altamente amplificada na reacção de PCR. Após a amplificação das sondas por PCR, estas são detectadas e identificadas por electroforese capilar, sendo gerado um padrão de picos por cada aplicação da amostra que quando comparados permitem inferir sobre o estado de metilação das regiões do DNA estudadas (Figura 12 d)). Nesta técnica, a identificação das diferentes sondas por electroforese capilar é também baseada na diferença de tamanho entre elas, tal como no caso do MLPA convencional^{100,102}.

Na reacção de MS-MLPA, também não é a sequência de DNA alvo que é amplificada, mas sim as sondas de MLPA que com ela hibridizam e que não sofrem a acção da endonuclease devido à protecção conferida pelo DNA metilado. Deste modo, o número de sondas amplificadas é uma medida semi-quantitativa do estado de metilação do DNA¹⁰⁰.

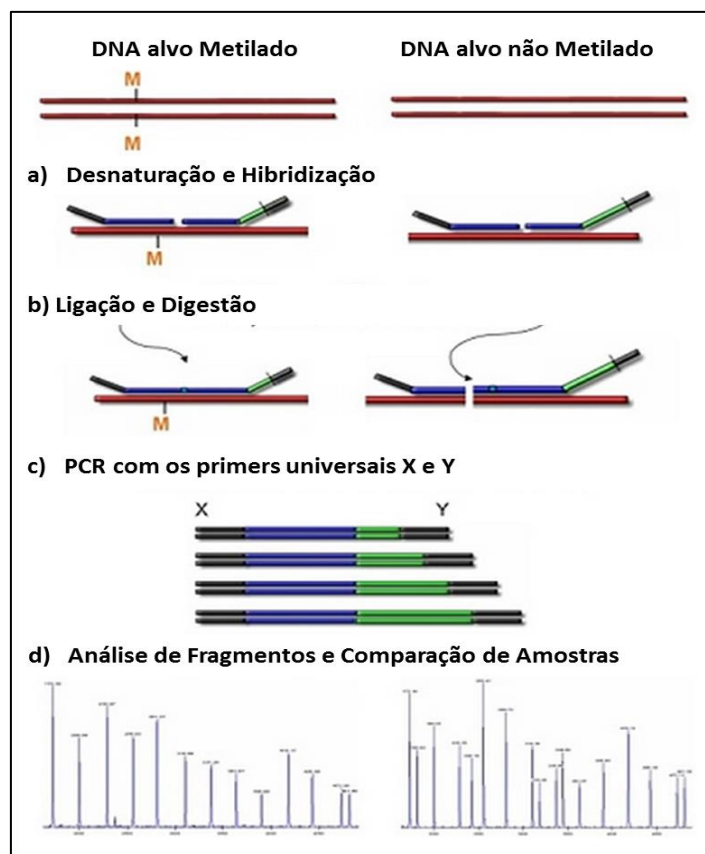


Figura 12: Representação esquemática das etapas do procedimento experimental da técnica de MS-MLPA. **a)** Desnaturação e hibridização do DNA seguida de divisão do produto de reacção; **b)** A um dos produtos de reacção adiciona-se a ligase (reacção de ligação) e no outro produto de reacção adiciona-se a ligase e a endonuclease (reacção de ligação e digestão); **c)** Reacção de PCR utilizando dois *primers* universais, X e Y; **d)** Análise de fragmentos. (Adaptado de ¹⁰³)

Nos últimos anos, a quantidade de estudos que utilizam a técnica MS-MLPA têm vindo a aumentar^{18,98}. Esta técnica é muito importante não só para estudar doenças relacionadas com fenómenos de *imprinting*, como por exemplo as síndromes de Prader Willi/Angelman e Beckwith-Wiedmann/Russell-Silver, mas também na detecção da inactivação de genes supressores tumorais e na avaliação da resistência a agentes quimioterapêuticos^{100,102}.

10.3. Array-based Comparative Genomic Hybridization - aCGH

O aCGH é uma técnica de genómica que foi descrita por Lucito e colaboradores em 2003¹⁰⁴. Esta técnica foi descrita com o objectivo de detectar amplificações e deleções em amostras tumorais. Porém, actualmente é também muito utilizada no estudo de doentes com atraso de desenvolvimento, alterações no espectro do autismo, anomalias congénitas múltiplas entre outros^{104,105}.

Na técnica de aCGH iguais quantidades de DNA genómico marcado, referente a uma amostra em estudo e a uma amostra referência, são co-hibridizados num *array* que contém sondas de DNA. Estas sondas, apresentam-se fixadas a uma lâmina (suporte físico) e podem ser fragmentos de DNA genómico humano clonados a partir de bactérias (BAC – *Bacterial Artificial Chromosome*) ou oligonucleótidos sintéticos^{87,105}. Esta técnica pode apresentar uma cobertura global do genoma de tal forma que, o número de sondas por hibridização pode variar na ordem dos milhares ou milhões de sondas. O limite de resolução do aCGH está dependente do espaçamento e do comprimento das sondas de DNA. Deste modo, a resolução da técnica varia consoante a plataforma utilizada^{87,105,106}. A quantidade de DNA genómico utilizada num teste deste tipo varia também de acordo com a plataforma utilizada¹⁰⁶.

Quanto ao procedimento experimental (Figura 13), esta técnica implica a utilização de um DNA controlo/referência e do DNA da amostra em estudo. Os dois DNAs, após fragmentação por acção do calor, são marcados com fluorocromos diferentes, um a verde - *Cyanine 3* (Cy3) e um a vermelho – *Cyanine 5* (Cy5). De seguida os dois DNAs são co-hibridizados na lâmina de *array* que contém as sondas

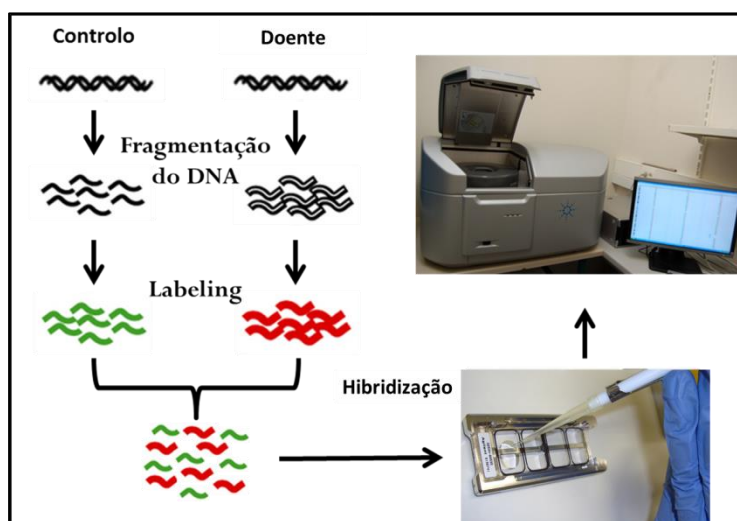


Figura 13: Representação esquemática do procedimento experimental da técnica de aCGH. (Proveniente de: Laboratório de Citogenética e Genómica, FMUC, 2013).

específicas para cada região do genoma. Após a hibridização, as lâminas são colocadas num *scanner* que quantifica a fluorescência emitida por cada fluorocromo. A quantificação da fluorescência emitida pelo DNA marcado a verde (Cy3) e a vermelho (Cy5) é detectada, alternadamente, sob a incidência de um feixe de luz com um comprimento de onda de 523 nm e 635 nm, respectivamente¹⁰⁷. A detecção de

alterações desequilibradas resulta da interpretação do rácio Cy3/Cy5 para cada região do genoma estudada, isto porque, em caso de haver variações no número de cópias entre o DNA do paciente e o DNA controlo, a taxa de hibridização dos dois DNAs vai ser diferente, bem como os índices de fluorescência para os dois fluorocromos, o que permite a identificação das alterações.

10.4. Outras técnicas complementares

Tanto o MLPA como o aCGH apresentam limitações, sendo que nenhuma destas técnicas permite a detecção de rearranjos equilibrados ou mosaicismos de baixa expressão⁸⁷. Assim, o estudo do cariótipo assume uma elevada importância como técnica complementar. O cariótipo possibilita a detecção de alterações cromossómicas numéricas e estruturais (incluindo alterações equilibradas) bem como a caracterização dos diferentes complementos cromossómicos de um tumor⁸⁷. O limite mínimo de resolução para a detecção de alterações ronda os 5-10 Mb (bandagem GTG), dependendo da região cromossómica⁸⁷. Para além do que já foi referido anteriormente, o aCGH apresenta também algumas dificuldades na interpretação dos resultados, devido ao elevado número de dados obtidos, e é também uma técnica dispendiosa⁸⁷. A técnica de FISH é de igual modo importante como técnica complementar em estudos relacionados com cancro. Esta técnica recorre à utilização de sondas marcadas com fluorocromos que hibridizam com as sequências complementares do DNA alvo, sendo possível detectar a presença de deleções, amplificações e também rearranjos equilibrados¹⁰⁸. As principais vantagens da utilização desta técnica são a possibilidade de se avaliar a existência de rearranjos equilibrados, o estudo de mosaicos de baixa expressão bem como a possibilidade de utilização de células em interfase^{87,108}.

11. Objectivos

Os principais objectivos do estudo foram:

- A caracterização do perfil genómico de biópsias de CB pelas técnicas de MLPA, MS-MLPA, FISH e aCGH;
- A avaliação do padrão de metilação de determinadas regiões genómicas de biópsias de CB por MS-MLPA;

A detecção de alterações genéticas desequilibradas e epigenéticas (ao nível do padrão de metilação) assumem uma extrema relevância na compreensão dos

mecanismos moleculares intervenientes no processo de carcinogénese. Um melhor conhecimento destes mecanismos associados ao CB será uma importante mais-valia não só ao nível das estratégias de diagnóstico, na adaptação da terapêutica e na avaliação do prognóstico de cada doente, mas também terá um papel relevante no seguimento dos pacientes com esta neoplasia.

Foram também objectivos deste estudo:

- A optimização da utilização de DNA extraído de células da bexiga excretadas na urina, bem como a validação das técnicas de MLPA e MS-MLPA, em DNA extraído de urina, como metodologias sensíveis, específicas e economicamente viáveis no estudo de doentes com CB;

A capacidade de utilização de amostras provenientes deste biofluido em técnicas de biologia molecular, como o MLPA e o MS-MLPA, é muito relevante na obtenção de uma estratégia não invasiva, sensível e economicamente viável para o diagnóstico, caracterização e seguimento deste tipo de doentes. Contudo, para que seja possível obter DNA extraído de amostras de urina com qualidade e concentrações ideais foi necessário otimizar e validar o procedimento experimental de extracção de DNA de urina.

- Estabelecimento de culturas primárias de CB;

O estabelecimento de culturas celulares é extremamente importante neste tipo de estudos pois permite, não só a sua utilização mas também a conservação das amostras para estudos futuros.



Capítulo II

Materiais e

Métodos

Capítulo II – Materiais e Métodos

1. Pacientes e Amostras

Neste estudo foram incluídas 14 biópsias tumorais recolhidas, com o consentimento informado, de 14 doentes com diagnóstico de CB, provenientes do Serviço de Urologia e Transplantação Renal do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SUTR - CHUC). Estas amostras foram recolhidas no período compreendido entre Setembro de 2012 e Julho de 2013. As amostras foram obtidas por ressecção transuretral sendo que as amostras enviadas para o Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG – FMUC) correspondem ao excedente das peças tumorais, colhidas em espelho e enviadas para o serviço de Anatomia Patológica. Como controlos, foram utilizadas quatro biópsias de doentes, sem história clínica de CB, que foram sujeitos a procedimentos cirúrgicos com base na correcção de alterações ao nível da próstata.

O tecido foi recolhido da peça cirúrgica, tendo como objectivo o estabelecimento de culturas celulares e a extracção de DNA. O tecido recolhido para estabelecer culturas celulares foi armazenado e transportado em *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) suplementado com 2% de penicilina e estreptomicina (P+S) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). O tecido para a realização da extracção de DNA foi armazenado em Tampão Fosfato Salino (PBS) até à realização do referido procedimento.

Neste estudo foi ainda incluída uma amostra de urina de cada doente colhida imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico, para posterior realização de extracção de DNA. Cada amostra de urina utilizada no estudo resulta do excedente enviado também para o serviço de Anatomia Patológica com vista à realização da citologia urinária.

De todos os doentes considerados no estudo foram recolhidos alguns dados de carácter informativo, tais como: a idade (aquando do diagnóstico), o sexo, o estadio e grau do tumor com base no sistema TNM e na classificação definida pela OMS em 1973. Os dados considerados para cada doente estão representados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados clínicos dos doentes incluídos no estudo.

Doente	Sexo	Idade	Estadio/Grau	Recidiva
Amostras tumorais				
1	♀	74	T1,G2	Sim
2	♀	85	T1,G3	Não
3	♂	77	Ta,G1	Não
4	♂	67	T1,G3	Sim
5	♂	68	T1,G1	Não
6	♂	61	T1,G2	Não
7	♀	86	T1,G2	Não
8	♀	85	T1,G2	Não
9	♂	83	T1,G1	Não
10	♂	83	T3a,G3	Não
11	♂	66	Ta,G1	Não
12	♂	75	T1,G1	Não
13	♂	72	T1a,G1	Não
14	♂	64	T1,pTis,G2	Não
Amostras não tumorais				
C1	♂	80	/	/
C2	♂	67	/	/
C3	♂	67	/	/
C4	♂	72	/	/

2. Extracção de DNA

2.1. Extracção de DNA de biópsias tumorais e de controlos

Para a extracção de DNA a partir das amostras de tecido (quer tumorais quer controlos) foi utilizado um *kit* de extracção comercial - *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O procedimento experimental executado esteve de acordo com o descrito pelo fabricante (ver anexo II). De um modo geral, a extracção de DNA por este *kit* compreende várias etapas. Inicialmente ocorre a digestão do tecido por acção de um tampão de lise e da *proteinase K*. De seguida recorre-se a um sistema de colunas de sílica com afinidade para o DNA seguindo-se várias etapas de lavagem de forma a purificar o DNA. Finalmente a eluição do DNA é realizada com um eluente específico para o efeito.

2.2. Extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina

Para a extracção de DNA de células provenientes da bexiga e excretadas na urina foram inicialmente testados dois *kits* de extracção comerciais. Os *kits* testados foram - *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e o *UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, California) (consultar protocolos detalhados nos anexos III e IV). Após uma análise cuidada das características do DNA obtido pelos diferentes métodos de extracção optou-se pela utilização do *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*. Neste trabalho foi também avaliada a pertinência da realização de um tratamento das amostras de urina previamente à aplicação do método de extracção de DNA. Este pré-tratamento consistiu em ciclos de lavagens com PBS e centrifugações consecutivas de forma a aumentar os graus de pureza das amostras.

De uma forma genérica, inicialmente as amostras de urina foram sujeitas a um pré-tratamento que consiste na realização de vários ciclos de centrifugação e lavagens dos *pellets* com PBS, de forma a aumentar a pureza da amostra. De seguida, iniciou-se o processo de extracção de DNA de acordo com o descrito pelo fabricante. O procedimento experimental do *kit* utilizado (*QIAamp® Viral RNA Mini Kit*) baseia-se na extracção de DNA em coluna de tal forma que, numa fase inicial, verifica-se a digestão celular, seguida de ligação do DNA à coluna e respectivas lavagens. No final do procedimento o DNA é eluído recorrendo a um tampão de eluição.

3. Quantificação e análise da integridade das amostras

Posteriormente à extracção de DNA das amostras, procedeu-se à quantificação e avaliação do grau de pureza utilizando um espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA) para esse efeito. Os graus de pureza são avaliados com base no quociente entre a absorvância a 260 nm e 280 nm e entre 260 nm e 230nm. A avaliação destes rácios permite não só avaliar a concentração de DNA da amostra, visto que os ácidos nucleicos absorvem a 260 nm, mas também detectar a presença de contaminantes existentes na amostra, como por exemplo fenóis, proteínas entre outros. Uma amostra de DNA é considerada pura quando o quociente de absorvância 260/280 é cerca de 1,8 e o quociente de absorvância 260/230 varia entre 1,8 e 2,2¹⁰⁹.

As amostras consideradas no estudo foram ainda avaliadas no que diz respeito à integridade do DNA. A avaliação da integridade das amostras foi realizada recorrendo a

electroforeses em gel de agarose 2,5% (p/v), corado com *GreenSafe* (Nzytech, Lisboa, Portugal). Em cada electroforese foi utilizado o marcador de peso molecular *50 pb DNA Step Ladder* (Promega, Corporation, Wisconsin, USA) e a separação do DNA foi realizada a 100V durante 100 minutos. A imagem do gel foi captada por um *Bio-Rad ChemicDoc XRS System*, utilizando o *Quantity One Software* v4.2 (Bio-Rad, Hercules, California, USA). A Figura 14 corresponde a um exemplo em que é possível observar a existência de uma amostra com DNA fragmentado (Figura 14 (1)) e uma com DNA integro (Figura 14 (2))¹¹⁰.

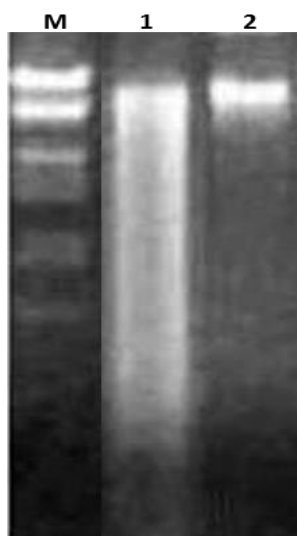


Figura 14: Imagem representativa de um gel de agarose; **M** – Marcador de pesos moleculares; **1** – DNA fragmentado; **2** – DNA sem fragmentação. (Adaptado de ¹¹⁰)

4. Análise por MLPA

Neste estudo foi testado um painel de sondas de MLPA específico para o CB de forma a detectar alterações do número de cópias de genes com relevância reportada para esta neoplasia. Este painel inclui 43 sondas para sequências alvo específicas sendo que nestas estão incluídas sondas para as mutações mais frequentemente observadas em casos de CB. As mutações estudadas envolvem os genes *FGFR3* e *PIK3CA*. Este painel de sondas inclui ainda 12 sondas referência. Os genes estudados pela técnica de MLPA e a sua localização cromossómica estão representados na Figura 15 e no anexo V.

Quanto ao procedimento experimental da técnica de MLPA, este foi realizado de acordo com o descrito em 2002 por Schouten e colaboradores⁸⁶. Resumidamente, em cada reacção de MLPA foram utilizados até 5 µL de DNA de forma a perfazer uma quantidade de DNA entre 80 e 100 ng. Em casos de amostras muito concentradas, procedeu-se à realização de diluições em água *Nuclease-free* (Promega Corporation,

Wisconsin, USA) de forma a fazer o volume final de 5 μ L. O DNA foi desnaturado recorrendo a um termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems, Foster City, USA) durante 10 min a 98°C. De seguida adicionou-se 1,5 μ L de sonda juntamente com 1,5 μ L de tampão e posteriormente a amostra foi desnaturada durante 1 min a 95°C e as sondas permaneceram a hibridizar durante 15 horas a 60°C. Após a reacção de hibridização, adicionou-se 32 μ L de *Ligase-65 master mix* sendo que a reacção de ligação ocorreu a 54°C durante 15 min. De seguida, a ligase foi inactivada por acção do calor, a 98°C durante 5 min. Para a Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR) adicionou-se 10 μ L de *polymerase master mix*. A reacção de PCR ocorreu no termociclador ABI 2720 durante 35 ciclos: 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C, 1 min a 72°C e finalmente uma extensão final de 20 min a 72°C. Para a aquisição dos resultados, 1 μ L de produto de PCR juntamente com 0,3 μ L de *GenescanTM 500 RoxTM size standard* (Applied Biosystems, Foster City, USA) e 9,1 μ L de formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, USA) foram desnaturados durante 5 min a 98°C e seguidamente separados por um sistema de electroforese capilar – *ABI PRISMTM 3130* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os resultados foram analisados com o *software GeneMapper v4.1* (Applied Biosystems, Foster City, USA) de forma a permitir a análise cuidada dos electroferogramas referentes a cada fragmento amplificado e para garantir o controlo de qualidade do procedimento executado. Para a obtenção dos resultados finais, recorreu-se ao *software Coffalyser.net* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que calcula um rácio, para cada sonda, entre as amostras em análise e os controlos.

Em cada reacção foram utilizados três controlos representativos da população saudável, que correspondem a indivíduos do sexo masculino sem história clínica de CB, e um controlo negativo (sem DNA). Neste estudo, sempre que os valores correspondentes ao número de cópias eram $\leq 0,83$ foram considerados como perdas e valores $\geq 1,17$ foram considerados como ganhos de material genético.

5. Análise por MS-MLPA

Para a realização da técnica de MS-MLPA utilizou-se o painel de sondas ME002 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que contém 41 sondas que permitem detectar alterações do número de cópias de sequências específicas de DNA. Entre estas 41 sondas, estão incluídas 27 que possibilitam também o estudo do padrão de metilação

de 25 genes supressores tumorais. Os genes estudados pela técnica de MS-MLPA e a sua localização cromossómica estão representados na Figura 15 e no anexo V.

Neste estudo o procedimento experimental executado esteve de acordo com o descrito em 2005, por Nygren e colaboradores¹⁰². O procedimento experimental da técnica de MS-MLPA é semelhante ao da técnica de MLPA, contudo requer a utilização da enzima de restrição HhaI que reconhece locais de restrição e induz a quebra das sequências de DNA, na ausência de DNA metilado. Resumidamente, em cada reacção de MS-MLPA foram utilizados até 5 µL de DNA de forma a perfazer uma quantidade de DNA entre 80 e 100 ng sendo que, a reacção de desnaturação e hibridização decorreram de acordo com o igualmente descrito para a técnica de MLPA. Após a reacção de hibridização, adicionou-se 3 µL de *Ligase buffer A* e 10 µL de água *Nuclease-free* (Promega Corporation, Wisconsin, USA) a cada *ependorf*. De seguida transferiu-se 10 µL de produto de reacção para um novo tubo. Após a repetição deste processo para todas as amostras, aumentou-se a temperatura para 48°C e adicionaram-se 10 µL de *Ligase-65 master mix* à primeira série de *ependorfs* (correspondentes à avaliação do número de cópias). Na outra série adicionaram-se 10 µL de *Ligase-Digestion mix* que contém a enzima de restrição HhaI (10 unidades/µL) (Promega Corporation, Wisconsin, USA). A reacção de digestão e ligação ocorreram durante 30 min a 48°C seguida de inactivação das enzimas por acção do calor durante 5 min a 98°C. O restante procedimento experimental da técnica de MS-MLPA está igualmente de acordo com o descrito anteriormente para a técnica de MLPA. A única excepção verifica-se aquando da aplicação das amostras no sequenciador em que no caso da técnica de MS-MLPA apenas se aplica 0,75 µL de produto de PCR juntamente com 0,3 µL de *GenescanTM 500 RoxTM size standard* (Applied Biosystems, Foster City, USA) e 9,1 µL de formamida desionizada (Applied Biosystems, Foster City, USA). Tal como para o MLPA, os resultados foram igualmente analisados com o *software GeneMapper v4.1* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Para a obtenção dos resultados, recorreu-se igualmente ao *software Coffalyser.net* (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que, no caso da avaliação do número de cópias, calcula um rácio entre as amostras em análise e as amostras controlo. Na avaliação do nível de metilação de cada sonda, o rácio é calculado entre a área do pico obtido referente ao número de cópias e a área do pico obtido no caso do estudo do padrão de metilação. Esta comparação dos electroferogramas é possível porque enquanto que na avaliação do número de cópias

todas as sondas são amplificadas por PCR e detectadas por electroforese (à excepção dos casos de deleções homozigóticas), no caso da avaliação da metilação, quando o DNA não está metilado a sonda correspondente é quebrada, não é amplificada por PCR e não é detectada por electroforese.

Em cada reacção foram utilizados três controlos representativos da população saudável, que correspondem a indivíduos do sexo masculino sem história clínica de CB, e um controlo negativo (sem DNA). Neste estudo, para a análise dos resultados foram estipulados três intervalos de metilação como representado na Tabela 8. Para todos os genes, à excepção do gene *MSH6*, foi considerado como ausência de metilação valores de percentagens até 15%. Porém, no caso de gene *MSH6*, devido ao facto de terem sido registados valores superiores a 15% de metilação para alguns casos controlo, decidiu-se considerar normal, valores até 20% de metilação

Tabela 8: Representação dos três intervalos de metilação considerados na avaliação dos resultados obtidos neste estudo.

Percentagem de metilação	Patamar de metilação
De 0% a 15%*	Não metilado
De 16%* a 50%	Metilado
Superior a 50%	Hipermetilado

* - para o gene *MSH6* o valor considerado foi 20%.

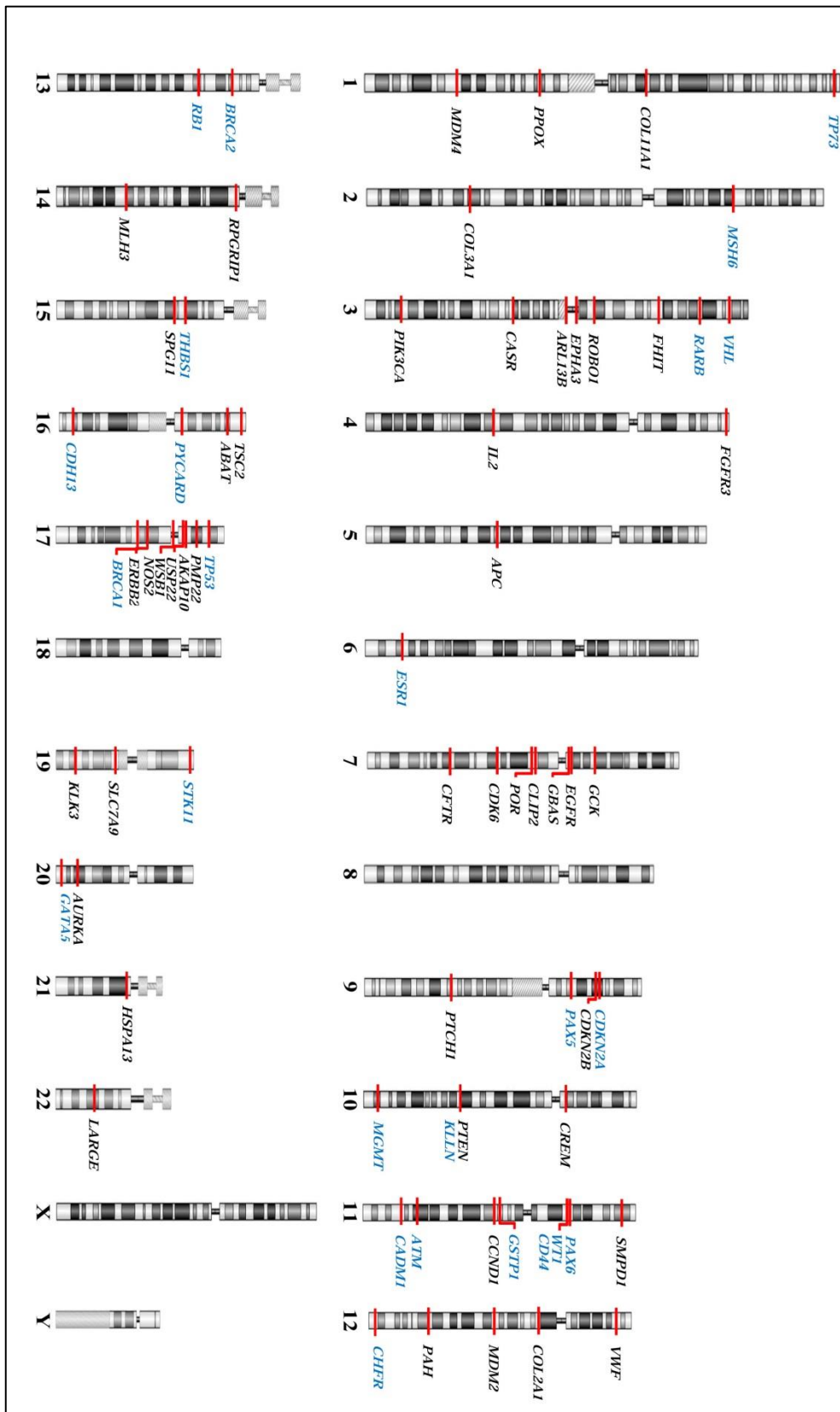


Figura 15: Representação dos genes estudados pelas técnicas de MLPA e MS-MLPA e as suas localizações cromossómicas. A preto estão representados os genes em que apenas foi avaliado o número de cópias. A azul estão representados os genes que, para além do estudo do número de cópias, foi também avaliado o estado de metilação.

6. Análise por aCGH

As lâminas de aCGH utilizada foram *Agilent Human Genome microarray 4x180* (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA) que incluem 180 000 sondas oligonucleotídicas dispersas por todo o genoma permitindo assim a detecção de variações do número de cópias em larga escala.

Quanto ao procedimento experimental, esta técnica foi realizada de acordo com o descrito pelo fabricante. Para cada amostra foram utilizadas entre 800 a 1100 ng de DNA num volume de 26 μ L. Quando necessário o volume foi complementado com água *Nuclease-free* (Promega Corporation, Wisconsin, USA). Numa fase inicial, o DNA foi desnaturado por acção do calor recorrendo a um termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, USA) a 95°C durante 10 min. De seguida, procedeu-se ao *Labeling* das amostras em que os DNAs a estudar foram marcados com o fluorocromo Cy5 e os controlos foram marcados com o fluorocromo Cy3. Os fluorocromos nunca são incorporados na totalidade pelo DNA de tal forma que é necessário proceder à remoção do fluorocromo excedente por um processo conhecido como *Clean-up*. Este processo é baseado num sistema de colunas que fixam o DNA e permitem a realização de sucessivas lavagens. Neste ponto é necessário avaliar o nível de incorporação do fluorocromo pelo DNA de forma a avaliar a eficácia do procedimento até aqui realizado. Para esse efeito foi utilizado um espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, USA). De seguida preparou-se a mistura de hibridização (*Cot-1 DNA* (1mg/mL), *Agilent 100x Blocking Agent*, *Agilent 2x Hi-RPM Hybridization Buffer*) à qual se adicionou o DNA marcado quer da amostra quer do respectivo controlo. O processo de hibridização ocorreu a 65°C durante 24 horas numa câmara de hibridização inserida num forno de hibridização (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA). Após o período de hibridização, as lâminas de *array* foram sujeitas a um processo de sucessivas lavagens de modo a remover ligações inespecíficas e o DNA marcado que não hibridizou com os oligonucleotidos fixados na lâmina. Para a obtenção dos resultados foi utilizado um *scanner - microarray G2565ca* (Agilent Technologies Inc, Santa Clara USA) - que detecta a emissão de fluorescência dos dois fluorocromos utilizados. A análise dos resultados obtidos foi realizada utilizando o *software Agilent Genomic Workbench v6.5* e recorrendo essencialmente à base de dados *UCSC Genome Browser*.

7. Cultura de células

O estabelecimento de culturas celulares primárias foi adoptado do procedimento descrito em 2005 por Fu e colaboradores¹¹¹. Resumidamente, após a realização do acto cirúrgico, as amostras foram colocadas e transportadas em HBSS suplementado com 2% P+S (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Posteriormente, o tecido foi fragmentado e distribuído homogeneamente numa caixa de cultura T-25 previamente revestida com colagénio tipo 1 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). O meio de cultura utilizado foi o *Ham's F12 Nutrient Mixture* (F-12) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) suplementado com insulina (100 U/mL), aminoácidos não essenciais (0,5 mL da solução *stock* a 10 mM), hidrocortisona (1000 µg/mL), transferrina humana (500 µg/mL), dextrose (0,27 g/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), P+S (2%), L-Glutamina (200 mM) e soro fetal bovino (FBS) (entre 1% aquando da sementeira, 10% após um mês da sementeira) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). A cada cinco a sete dias foi avaliado o crescimento da cultura e mudado o meio de cultura.

Para o estabelecimento de subculturas utilizou-se a *StemPro® Accutase®* (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para libertar as células da superfície aderente.

8. Análise por FISH

Neste estudo, foi utilizado o teste UroVysion® (Abbott Molecular Inc, Illinois, USA). Previamente à aplicação do procedimento experimental do teste UroVysion® as células em cultura foram sujeitas a várias etapas de preparação. Inicialmente, as células foram sujeitas à acção de CRA (0,01%) (*Chromosome Resolution Additive*) e posteriormente da colcemida (0,2 µg/mL) de forma a haver uma estimulação da divisão celular seguida de um bloqueio da mesma em pró-metáfase. Posteriormente, as células em cultura foram dissociadas por acção da *StemPro® Accutase®* (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e as células em suspensão foram colhidas e sujeitas a um tratamento hipotónico com KCL (0,05 M) que induz a sua turgescência. Seguidamente sujeitaram-se as células a um gradiente de fixação (ácido acético e metanol) que confere resistência às células de modo a evitar o seu rebentamento prematuro. Finalmente, procedeu-se ao espalhamento sob condições de humidade e temperatura controladas.


O procedimento experimental executado para o teste UroVysion® consistiu numa adaptação do procedimento descrito pelo fabricante. De um modo geral, as lâminas

foram sujeitas a um tratamento com 2x *Standard Saline Citrate* (SSC) (pH = 7,0). Após este tratamento, as lâminas foram colocadas numa solução contendo pepsina que permitiu degradar a matriz extracelular. Subsequentemente, após várias lavagens das lâminas com PBS, estas foram sujeitas a um gradiente crescente de álcoois (70%, 85% e 100%) de forma a induzir a desidratação do material fixado na lâmina. Este passo de desidratação para a hibridização das sondas de FISH com o DNA alvo. Em áreas previamente seleccionadas foram adicionados 3 µL de sonda e a reacção de hibridização ocorreu durante cerca de 15 horas a 39°C numa câmara húmida e escura. Decorrido o período de hibridização, as lâminas foram sujeitas a sucessivas lavagens com diferentes gradientes de SSC e NP-40 de forma a eliminar ligações inespecíficas e a sonda não hibridizada remanescente. No final, foi utilizado um meio de montagem contendo DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*). Para a observação das lâminas recorreu-se a um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400, Melville, New York, USA) acoplado ao sistema *Cytovision* (Applied Imaging International Lda., Welzlar, Germany). Os filtros utilizados (Nikon, Melville, New York, USA) para detecção da fluorescência foram: Verde – B-2A; Vermelho – G-2A; *Aqua* – C57573; *Gold* – C57575; *DAPI* – UV-1A. Neste estudo a análise dos resultados foi realizada de acordo com os critérios descritos pelo fabricante.

9. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o programa *Statistical Package for Social Sciences v20.0* (Chicago, Illinois, USA). Para a caracterização da amostra recorreu-se ao cálculo da média, desvio padrão e frequência absoluta.

De forma a avaliar o grau de concordância entre os resultados obtidos por MLPA, para amostras provenientes de biópsias tumorais e de urinas, procedeu-se à realização de uma análise de kappa de Cohen. A análise de kappa baseia-se no número de respostas concordantes. Deste modo, valores de 1 correspondem a uma concordância completa e valores próximos ou abaixo de 0 indicam nenhuma concordância. A análise dos valores obtidos foi realizada de acordo com a classificação proposta por Landis e Koch¹¹² em 1977.



Capítulo III

Resultados e Discussão

Capítulo III – Resultados e Discussão

1. Caracterização dos doentes envolvidos no estudo

Neste estudo foram analisados 14 doentes com diagnóstico de cancro da bexiga. A idade média (\pm SD) dos doentes estudados é 74,71 (\pm 8,65) anos (idades compreendidas entre os 61 e os 86 anos) sendo 71,4% (10/14) dos indivíduos do sexo masculino e 28,6 (4/14) do sexo feminino, como representado na Tabela 9.

Apesar da pertinência da informação, dados como os hábitos tabágicos, a profissão dos doentes e a região anatómica da bexiga em que os tumores se encontravam não foi considerada neste estudo devido à inacessibilidade desta informação.

Quanto à classificação anatomo-patológica, 14,3% (2/14) dos tumores estudados eram do tipo Ta,G1; 28,6% (4/14) do tipo T1,G1; 28,6% (4/14) do tipo T1,G2; 14,3% (2/14) do tipo T1,G3 e 7,1% (1/14) do tipo T3a,G3. Para além dos tumores referidos foi ainda incluído um tumor (7,1% - 1/14) que apresentava simultaneamente um tumor T1,G2 com um Tis.

Tabela 9: Caracterização dos doentes com CB incluídos no estudo

	N.º Doentes (14)	Percentagem (%)
Masculino	10	71,4
Feminino	4	28,6
Idade		
≤ 65	2	14,3
> 65	12	85,7
Classificação anatomo-patológica Sistema TNM – Estadio T		
Ta	2	14,3
Tis	0*	0
T1	11	78,6
T2	0	0
T3	1	7,1
T4	0	0
Grau (WHO, 1973)		
G1	6	42,9
G2	5	35,7
G3	3	21,4

* Neste estudo não foi incluído nenhum Tis, porém um dos tumores T1 apresenta simultaneamente um Tis, como referido anteriormente.

Quanto aos controlos, foram utilizados quatro com uma média (\pm SD) de idades de 71,5 (\pm 6,14) anos (idades compreendidas entre os 67 e os 80 anos).

Na Tabela 9, estão representadas as características gerais dos doentes com CB incluídos no estudo.

2. Optimização do procedimento experimental de extracção de DNA

O processo de extracção de DNA é considerado essencial no que diz respeito à utilização deste ácido nucleico em técnicas de biologia molecular e genómica. Isto deve-se ao facto de, neste tipo de técnicas, para além da concentração de DNA o seu grau de pureza ser também de extrema relevância. Neste âmbito, optimizou-se o processo de extracção de DNA de células da bexiga excretadas na urina, de forma a garantir uma amostra com qualidade suficiente. O DNA de células excretadas na urina foi extraído por 2 métodos distintos (*QIAamp® Viral RNA Mini Kit* – Qiagen®; *UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit* - MO BIO) e sujeito, em alguns casos, a diferentes tipos de pré-tratamentos conforme descrito abaixo. A optimização foi feita em 5 amostras teste diferente (UT1 a UT5) de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10: Valores referentes à concentração e pureza do DNA obtidos pela aplicação dos métodos de extracção de DNA utilizados.

Amostras	Método	[DNA(ng/ μ L)]	260/280	260/230
UT1	Qiagen®	298,7	2,07	-7,78
UT2	Qiagen®	189,5	2,56	-3,68
UT3	Qiagen® + Pré-tratamento 1	46,4	2,04	0,09
UT4	Qiagen® + Pré-tratamento 2	32,5	2,09	0,07
UT5	MO BIO®	13,5	0,8	0,25

(UT – Urina Teste; Pré-tratamento 1 – 1 lavagem dos *pellets* de urina com PBS; Pré-tratamento 2 - 2 lavagem dos *pellets* de urina com PBS e aumento das velocidades de centrifugação)

2.1. Método *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* – Extracção de DNA de células excretadas na Urina

Nas amostras de urina (UT1 e UT2) o DNA foi extraído pela aplicação directa do método *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) (Qiagen®). Como pode ser observado na Tabela 10, obtiveram-se concentrações elevadas de DNA o que não é frequente para este tipo de amostras devido ao reduzido nível de esfoliação

celular verificado na bexiga. Um DNA é considerado puro quando o rácio de absorvância 260/280 está próximo de 1,8 e o rácio 260/230 está entre os 1,8 e os 2,2¹⁰⁹. Como se pode observar na Tabela 10 as amostras UT1 e UT2 apresentam valores para o rácio 260/230 muito inferiores. Segundo estes rácios, parece haver a indicação da presença de contaminantes na amostra, que absorvem a um comprimento de onda de 230 nm. Compostos orgânicos como o álcool, a guanidina, o isotiocianato e também alguns componentes celulares como os hidratos de carbono são contaminantes que estão frequentemente associados a alterações nos rácios de pureza.

Na literatura, vários estudos optam pela realização de um tratamento das amostras de urina previamente à realização do procedimento de extracção de DNA^{18,67,113}. Neste estudo avaliou-se a pertinência da realização de um tratamento prévio das amostras de urina, tendo sido realizados vários testes de modo a compreender qual a metodologia mais eficiente.

Numa primeira abordagem, procedeu-se à extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina utilizando um pré-tratamento (pré-tratamento 1) descrito por Zuiverloon e colaboradores⁶⁷ em 2011. Tal como se pode observar na Tabela 10, a amostra extraída por este processo (UT3) obteve uma concentração de DNA muito inferior às amostras extraídas directamente pelo método da Quiagen® sem pré-tratamento (UT1 e UT2). Quanto aos graus de pureza, o rácio de absorvância 260/280 mantem-se muito semelhante porém, o rácio 260/230, apesar de não apresentar valores negativos ainda continua sem estar dentro dos limites recomendados para uma amostra pura. Apesar disso, decidiu-se realizar a técnica de MLPA nas amostras referidas anteriormente (UT1, UT2 e UT3).

Com a aplicação da técnica de MLPA verificou-se que as concentrações das amostras extraídas pela aplicação directa do método da Qiagen® não são correspondentes com o resultado obtido pelo NanoDrop®. Este facto pode ser observado na Figura 16 em que o electroferograma correspondente à amostra UT2 apresenta picos bem expressos correspondentes aos fragmentos Q. Por outro lado, pela análise do electroferograma desta mesma amostra (Figura 16) é também perceptível que o processo de desnaturação não foi bem sucedido. No electroferograma observa-se que os picos correspondentes aos fragmentos D são muito pequenos, sendo, em alguns casos, do mesmo tamanho que os picos correspondentes aos fragmentos Q. Igualmente neste caso, os picos referentes às diferentes sondas incluídas no painel também não apresentam um perfil normal, isto porque, para além de não se verificar amplificação de

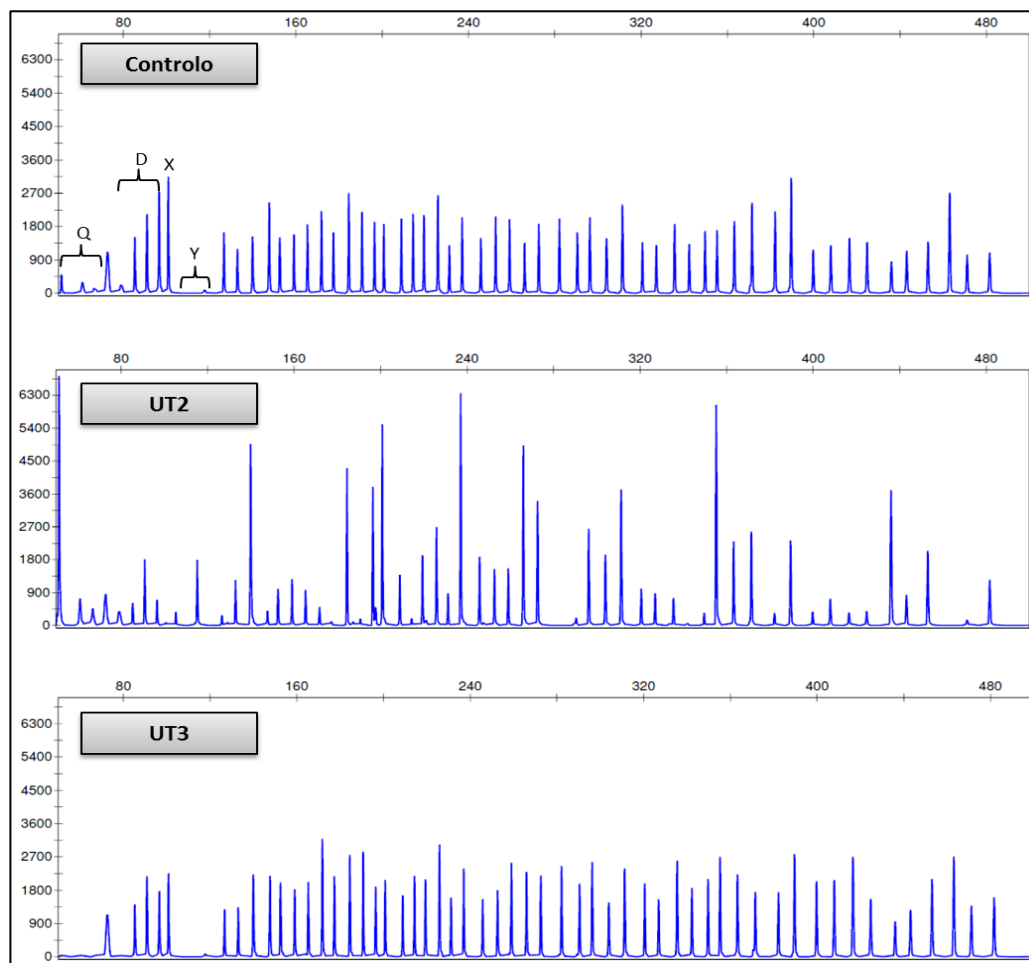


Figura 16: Electroferogramas obtidos pela realização da técnica de MLPA em amostras de DNA extraído de células da bexiga excretadas na urina. (UT – Urina Teste)

todas as regiões estudadas, observa-se a presença de pequenos picos que não correspondem a fragmentos reais.

Os painéis de sondas utilizados na técnica de MLPA incluem fragmentos específicos de DNA que, após a reacção de PCR, permitem inferir sobre a quantidade de DNA presente da amostra e sobre a qualidade do processo de desnaturação ocorrido¹⁰⁰. Numa amostra com uma concentração e pureza de DNA óptimos (Controlo - Figura 16) os quatro picos iniciais do electroferograma (Fragmentos Q) não devem ser observáveis. Esses fragmentos de DNA estão presentes no painel de sondas em tão reduzidas quantidades que apenas são expressos na ausência de elevadas quantidades de DNA da amostra em estudo¹⁰⁰. Assim sendo, a expressão destes picos é inversamente proporcional à quantidade de DNA utilizada para a realização da técnica. Quanto à desnaturação do DNA (Fragmentos D), as sondas incluídas nos painéis de MLPA são específicas para determinadas regiões do genoma com um elevado conteúdo em GC, de difícil desnaturação. Quando ocorrem problemas no processo de desnaturação do DNA

as sondas apresentam dificuldades em hibridizar e simultaneamente verifica-se uma menor expressão dos picos correspondentes.

De acordo com a literatura, a presença de contaminantes em amostras a aplicar em técnicas de biologia molecular e genómica são extremamente prejudiciais^{86,100}. Por exemplo, a presença de fenóis nas amostras está associada a uma inibição da reacção de PCR. Deste modo, mesmo que o processo de desnaturação e hibridização sejam bem sucedidos, a amplificação exponencial dos fragmentos não ocorre limitando assim a obtenção de resultados reais. De acordo com Schouten e colaboradores⁸⁶ (2002) a presença de fenóis numa amostra pode induzir alterações nos desvios-padrão na ordem dos 4% a 10%⁸⁶. A presença excessiva de sais, tais como NaCl ou KCl, são também prejudiciais à realização deste tipo de técnicas¹⁰⁰. Elevadas concentrações de sais estão relacionadas com uma desnaturação incompleta do DNA essencialmente nas regiões mais ricas em GC¹⁰⁰.

De um modo geral, as amostras extraídas directamente pelo método da Qiagen® (UT1 e UT2) não reúnem as características necessárias à utilização em técnicas como o MLPA. No entanto, como se pode observar na Figura 16, a amostra sujeita ao pré-tratamento (UT3) possui características mais satisfatórias. Não só não apresenta indícios de falta de DNA, o que sugere que a concentração de DNA da amostra está de acordo com o obtido pelo NanoDrop®, mas também que quer os picos referentes à desnaturação do DNA quer os picos respectivos às diferentes sondas, apresentam características muito semelhantes à amostra considerada como controlo. Este aumento da qualidade do DNA obtido pela realização do pré-tratamento 1 da amostra deverá estar associado com as sucessivas lavagens do *pellet* com PBS. Estas lavagens permitiram diluir, ou até mesmo eliminar, os contaminantes presentes na amostra.

Testaram-se ainda adaptações ao pré-tratamento 1 (Zuiverloon e colaboradores⁶⁷,2011) de forma a tentar obter amostras com um rácio de pureza 260/230 maior. Na literatura não existe consenso no que diz respeito às velocidades e períodos de centrifugação nem mesmo quanto ao número de lavagens dos *pellets* da urina com PBS. A amostra UT4 foi sujeita a um procedimento experimental alternativo, descrito por Zuiverloon e colaboradores¹⁸ em 2012 (pré-tratamento 2). As diferenças entre o pré-tratamento 2 e o pré-tratamento 1 consistem num ligeiro aumento das velocidades de centrifugação e na realização de duas lavagens do *pellet* de urina com PBS em vez de apenas uma. Observou-se que a realização de 2 lavagens dos *pellets* não induz qualquer alteração no que diz respeito aos graus de pureza do DNA obtido. Na Tabela 10,

observa-se que, quer as concentrações quer os rácios de pureza são muito semelhantes entre as amostras UT3 (pré-tratamento 1) e a amostra UT4 (pré-tratamento 2). A amostra UT4 foi também avaliada por MLPA e verificou-se que o electroferograma era semelhante ao obtido para a amostra UT3 (Figura 16). No que diz respeito às velocidades de centrifugação, foram também testadas várias velocidades (até 5000g), contudo não foram observadas alterações consideráveis quer nas concentrações de DNA quer nos graus de pureza. A uma velocidade de 5000g observou-se a formação de *pellets* consideráveis mas que não se traduziam num aumento da concentração de DNA.

2.2. Método *UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit* - Extracção de DNA de células excretadas na Urina

Testou-se também um segundo *kit* de extracção de DNA - *UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, California) (MO BIO®). Quanto à utilização do teste MO BIO®, extraiu-se DNA de amostras de urina sujeitas ao pré-tratamento 1 (UT5) tal como já descrito. A concentração de DNA obtida pela aplicação deste *kit* de extracção (amostra UT5) foi semelhante à obtida para a amostra sujeita ao pré-tratamento 1 e extraída pelo método Qiagen® (UT3). Porém, no que diz respeito aos graus de pureza, estes apresentam características significativamente piores do que as obtidas para o método Qiagen®. Quer o rácio de absorvância 260/280 quer o rácio 260/230 apresentam valores muito inferiores aos considerados para amostras puras (Tabela 10 – amostra UT5).

2.3. Avaliação da integridade do DNA

Para a avaliação da integridade do DNA das amostras recorreu-se à realização de géis de agarose 2,5% (m/v), tendo sido aplicados cerca de 250 ng de DNA de cada amostra no gel. Das amostras testadas apenas na UT5 foi aplicado menos quantidade de DNA (130 ng) visto que a concentração da amostra era muito reduzida. Pela análise do gel de agarose (Figura 17) é possível observar que, tal como indicava o electroferograma, a quantificação das amostras extraídas directamente pelo método da Qiagen® (UT1 e UT2) não é coincidente com o valor obtido pelo NanoDrop®. No gel de agarose não se observa qualquer marcação de DNA o que indica que estas amostras (UT1 e UT2) estão sobre-quantificadas e que, de facto, a quantificação errónea das amostras pelo NanoDrop® estará provavelmente associada à presença de

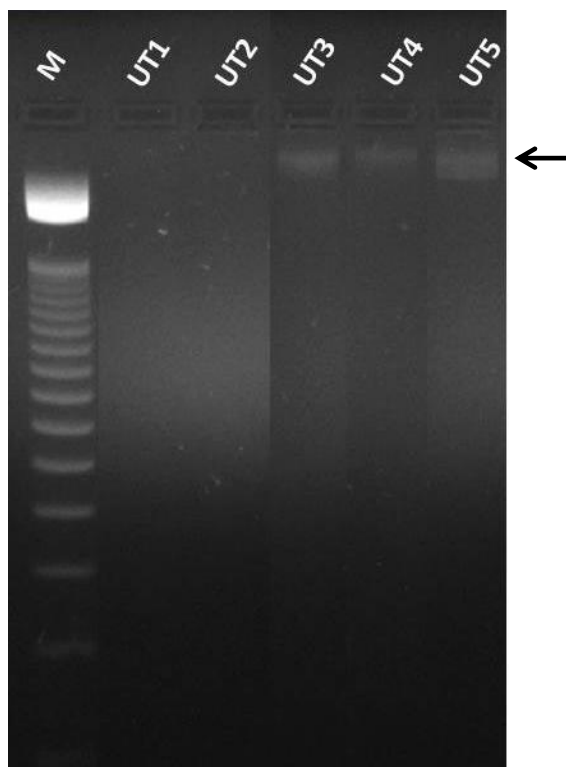


Figura 17: Imagem referente ao gel de agarose realizado para avaliação da integridade das amostras consideradas no processo de optimização do processo de extracção de DNA de células da bexiga excretadas na urina. A seta a preto indica a marcação de DNA existente na amostra. (M – Marcador de peso molecular; UT – Urina Teste)

contaminantes. No gel de agarose (Figura 17) é também perceptível que a concentração de DNA das amostras sujeitas ao pré-tratamento (UT3, UT4 e UT5) está mais próximo da realidade do que as amostras extraídas directamente pelo método da Qiagen® (UT1 e UT2). Contudo, apesar de ser observável a existência de marcação de DNA nas amostras UT3, UT4 e UT5, esta é muito ténue não se observando a presença de uma marcação bem definida. Por outro lado é de salientar que também no gel de agarose (Figura 17) não se observa nenhuma diferença entre a amostra sujeita ao pré-tratamento 1 (UT3) e a amostra sujeita ao pré-tratamento 2 (UT4). Na amostra extraída com o método da MO BIO® (UT5), no que diz respeito à integridade das amostras, não se revelou nenhuma alteração relevante em relação às restantes amostras sujeitas aos pré-tratamentos e extraídas pelo método da Qiagen® (UT3 e UT4) (Figura 17).

Com base nos resultados obtidos e descritos anteriormente, implementou-se a realização de um pré-tratamento das amostras de urina como um procedimento padrão no tratamento deste tipo de amostras. O pré-tratamento estipulado consiste numa adaptação entre o descrito por Zuiverloon e colaboradores^{18,67} em 2011 e 2012. De forma resumida o pré-tratamento aplicado às amostras de urina de doentes incluídos no estudo consistiu em:

1. Centrifugar as amostras de urina durante 10 min a 2000g;
2. Lavar os *pellets* com 10 mL de PBS e repetir a centrifugação anterior;
3. Ressuspender os *pellets* em 1 mL de PBS;
4. Centrifugar as amostras durante 5 min a 3000g;
5. Descartar os sobrenadantes e armazenar os *pellets* (-20°C) até à realização do procedimento de extracção de DNA;
6. Extrair o DNA pelo método *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen®).

Após a implementação do procedimento final do pré-tratamento (referido anteriormente) observou-se que efectivamente as amostras resultantes apresentam uma integridade óptima.

A Tabela 11 mostra-nos os valores de concentração e de pureza obtidos para algumas amostras incluídas no estudo (representantes da população estudada). As amostras correspondentes quer às urinas quer às biópsias tumorais apresentam rácios de absorvância 260/280 de acordo com o descrito para amostras consideradas puras. O rácio 260/230 apresenta valores ligeiramente elevados para as biópsias tumorais, contudo este aumento em relação aos valores padrão não é relevante. Para as amostras de DNA extraídas de urinas este rácio mantém-se baixo, contudo revelou-se adequado à execução das técnicas de biologia molecular e genómica a realizar. Quanto à integridade das amostras, foi também perceptível que a aplicação do pré-tratamento, tal como descrito anteriormente, possibilita a utilização de amostras de DNA extraídas de urina com qualidade perfeitamente utilizável. A Figura 18 corresponde ao gel de agarose realizado para as amostras (urinas e biópsias tumorais) representativas deste estudo. Como se pode observar, não se verifica a presença de qualquer arrastamento em qualquer amostra aplicada no gel. Verifica-se ainda que, a integridade do DNA extraído das amostras de urina é muito semelhante ao extraído directamente das amostras tumorais.

Tabela 11: Representação dos valores de concentração de DNA e dos rácios de pureza obtidos para as algumas amostras consideradas no estudo.

Amostras	[DNA(ng/ μ L)]	260/280	260/230
UDC3	94,3	1,83	1,22
UD8	66,1	1,9	0,18
UD10	94,3	1,91	0,32
UD13	231,8	1,86	0,73
BDC3	308,3	1,88	2,41
BD6	356,3	1,88	2,34
BD8	225,8	1,85	2,38
BD10	64,3	1,91	2,48
BD13	223,9	1,89	2,39

(UDC – Urina Doente Controlo; UD – Urina Doente; BDC – Biópsia Doente Controlo; BD – Biópsia Doente)

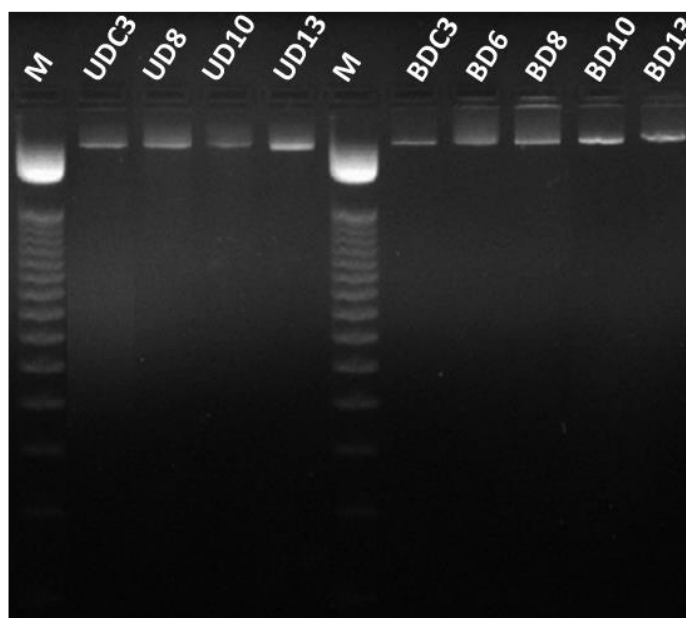


Figura 18: Imagem referente ao gel de agarose realizado para avaliação da integridade de algumas amostras (urinas e biópsias tumorais) incluídas no estudo. (M – Marcador de peso molecular; UDC – Urina Doente Controlo; UD – Urina Doente; BDC – Biópsia Doente Controlo; BD – Biópsia Doente)

3. Alterações genómicas detectadas pela técnica de MLPA

3.1. Análise por MLPA de DNA extraído de biópsias tumorais

Pela aplicação do painel de sondas de MLPA às amostras de DNA extraído de biópsias tumorais, detectaram-se 153 alterações das quais, 66 perdas, 83 ganhos e 4 mutações específicas envolvendo os genes *PIK3CA* (exão 21 - codão H1047L) e *FGFR3* (exão 7 e exão 10 – codão Y373C) como representado na Figura 19. Com este

painel de sondas de MLPA foram estudadas 55 regiões do genoma correspondentes a 36 genes. Os genes estudados estão listados e organizados de acordo com a sua localização no cromossoma (braço, região, banda e sub-banda) no anexo IV. Em alguns genes foram estudados vários exões e vários codões que serão assinalados na discussão e

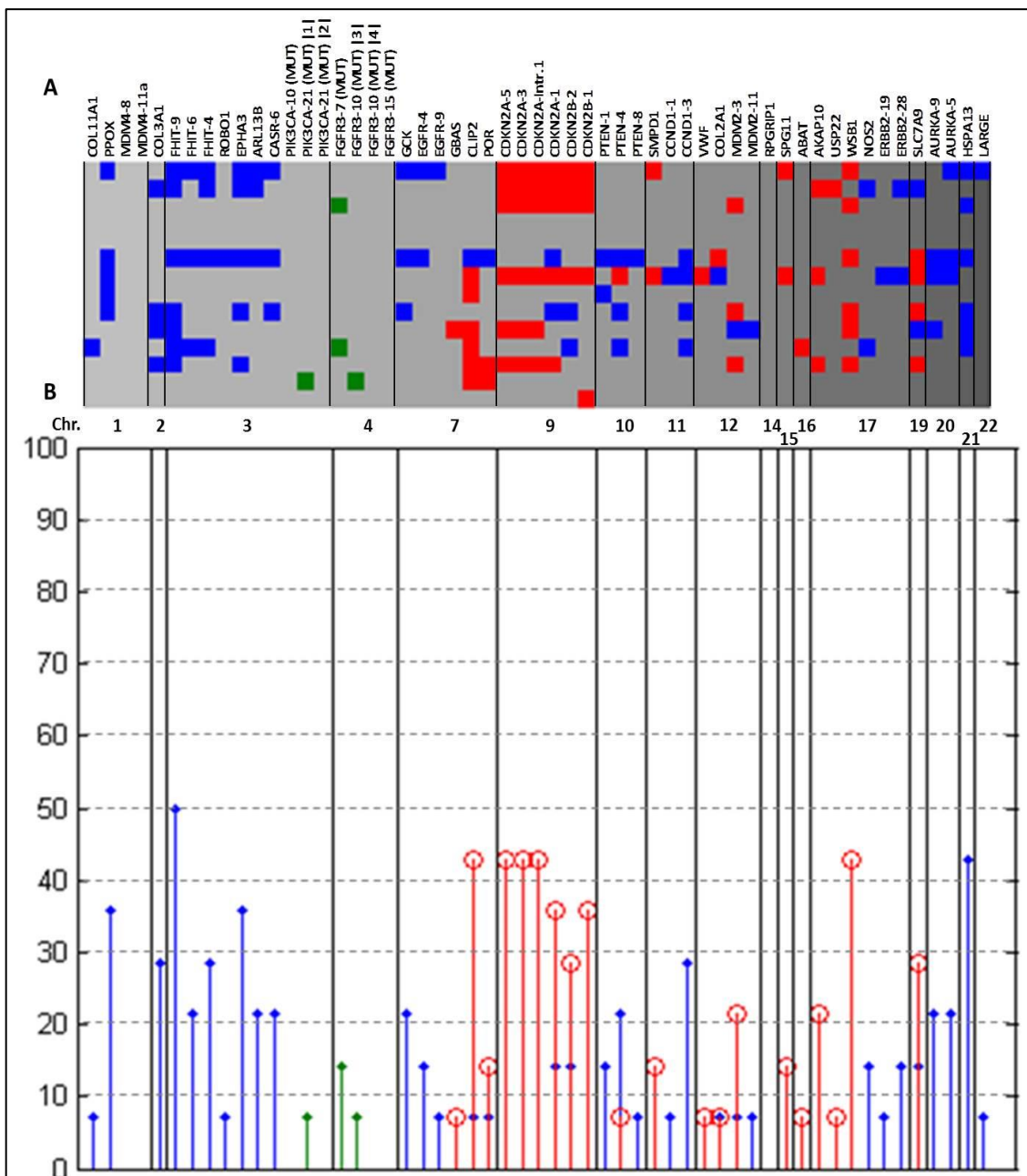


Figura 19: Resultados obtidos por MLPA em amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais; **A** – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); **B** - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma.

Legenda: Em cada coluna está representado um gene e, em determinados casos, o exão estudado (ex. *MDM4-8*: gene *MDM4*, exão 8); **Azul** - Ganho; **Vermelho** – Perda; **Verde** – Presença de mutação; **Cinzeno** – Sem alteração;|1| - H1047L; |2| - H1047R; |3| - Y373C; |4| - G370C.

interpretação dos resultados. Dos 14 doentes estudados, apenas os Doentes 4 e 5 não apresentaram qualquer alteração detectada por esta técnica. Com este painel de sondas foram estudados os cromossomas 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21 e 22. Estes cromossomas estão representados na Figura 19 (A) pela variação de intensidade da cor cinzento e pelas linhas verticais a preto. Na Figura 19 (B) os cromossomas estão representados pelas linhas verticais a preto.

Entre os cromossomas estudados, o maior número alterações (ganhos e perdas) foi observado para os cromossomas 3, 7, 9 e 17. Das regiões estudadas apenas 7 não apresentaram nenhuma alteração. Estas regiões dizem respeito aos genes *MDM4* (exões 8 e 11a) e *RPGRIP1* e às regiões de estudo de mutações correspondentes ao gene *PIK3CA* (exão 10 e exão 21-codão H1047R) e ao gene *FGFR3* (exão 10 codão G370C e exão 15). Quanto às regiões mais frequentemente alteradas, como se pode observar pela análise do histograma (Figura 19 (B)), existem vários genes com uma taxa de alteração relativamente elevada. Os genes *PPOX*, *FHIT* (exão 9), *EPHA3*, *CLIP2*, *CDKN2A* (exões 5, 3 e 1), *CDKN2A* (intrão 1), *CDKN2B* (exão 1), *WSB1* e *HSPA13* apresentam uma frequência de alterações (ganhos ou perdas) superior a 30%. Relativamente às mutações estudadas, apenas foram detectadas mutações em 21,4 % (3/14) dos doentes. As mutações observadas corresponderam a mutações no exão 21 do gene *PIK3CA* (codão H1047L) em 7,1% (1/14) dos casos, no exão 7 do gene *FGFR3* em 14,3% (2/14) e no exão 10 do mesmo gene (codão Y373C) em 7,1% (1/14) dos casos.

De seguida serão discutidas as alterações observadas em alguns genes e cromossomas com relevância no processo de carcinogénese da bexiga.

3.1.1. Cromossoma 3 – Genes *FHIT* e *EPHA3*

Neste estudo, o cromossoma 3 apresentou-se alterado em 50% dos casos estudados. Todas as alterações registadas corresponderam a ganhos sendo que os genes *FHIT* (exão 9) (3p14.2) e *EPHA3* (3p11.1) são os genes com maior frequência de alteração (50% e 35,7% respectivamente). Para todas as regiões estudadas no cromossoma 3 verificou-se que a frequência de alteração foi sempre superior a 20%. O Doente 6 apresentou ganho em todas as 7 sondas específicas para este cromossoma, sugerindo assim um ganho generalizado deste cromossoma.

Na literatura está descrito que no CB o cromossoma 3 apresenta-se frequentemente amplificado, porém, existem algumas regiões que estão associadas a perdas^{82,114}. O gene supressor tumoral *FHIT* é um desses casos. Este gene é um regulador do crescimento e divisão celular e a sua perda de função leva a um descontrolo da homeostase celular. Neste estudo, este gene apresentou-se frequentemente associado a ganhos, ao contrário do que está descrito na literatura. Contudo, a amplificação deste gene supressor tumoral poderá ser explicada pela existência de um ganho total ou parcial do cromossoma 3. Por outro lado, a existência de ganhos neste gene, não significa directamente que esteja a ser sobre-expresso. De acordo com a literatura, a inactivação do gene *FHIT* pode estar associado, em alguns casos, a alterações epigenéticas e não a deleções^{115,116}.

Na literatura, o gene *PIK3CA* apresenta-se mutado em cerca de 20% dos casos sendo que, as mutações mais frequentemente descritas, correspondem aos codões E542K, E545K, G1007R, H1047L e H1047R^{93,117}. O codão mais frequentemente alterado reportado na literatura é o E545K (52% das mutações)⁹³. Neste estudo, talvez devido ao reduzido número de amostras, não foi detectada qualquer mutação envolvendo este codão (codão E545K – localizado no exão 10). Neste estudo, apenas foram avaliadas as mutações correspondentes aos codões E545K, H1047L e H1047R do gene *PIK3CA*. Todavia, apenas foi registada uma mutação neste gene e que envolveu o codão H10047L.

3.1.2. Cromossoma 4 – Gene *FGFR3*

Neste estudo, foi avaliada a existência de mutações em 4 codões diferentes (S249C, G370C, Y373C e K650E) do gene *FGFR3* (4p16). Dos 14 doentes estudados, foram detectadas mutações em 3, sendo que em dois dos casos verificou-se a existência de mutação no codão S249C (exão 7) e num caso no codão Y373C (exão 10). É de salientar que os doentes em que se observou a presença de mutações são os Doentes 3, 11 e 13, que são portadores de tumores do tipo Ta,G1 (Doentes 3 e 11) e do tipo T1,G1 (Doente 13). Os nossos resultados mostram que efectivamente os casos em que se verificaram mutações neste gene correspondem aos tumores mais iniciais. Contudo esta relação deverá ser corroborada com o aumento do número de doentes analisados.

O gene *FGFR3* codifica um receptor membranar de factores de crescimento e está descrito na literatura que se encontra frequentemente mutado ou associado a ganhos, em

casos de CB¹¹⁸. Este oncogene encontra-se mutado em cerca de 70-80% dos tumores não invasivos e de baixo grau^{67,118}. A presença de mutações neste gene está associada a prognósticos favoráveis¹¹⁷. A presença de ganhos neste gene encontra-se associada a tumores invasivos¹¹⁸.

3.1.3. Cromossoma 7 – Gene *CLIP2*

Nos casos estudados foram observadas algumas deleções no cromossoma 7. Entre elas, é de salientar o gene *CLIP2* (7q11.23) que manifestou perda em 42,9% (6/14) dos casos estudados. Na literatura, o cromossoma 7 apresenta frequentemente ganhos de tal forma que, é um dos cromossomas estudados no teste UroVysion®¹¹⁹. Actualmente, são escassos os estudos envolvendo o gene *CLIP2* sendo que, a sua associação ao CB parece desconhecida. Num estudo desenvolvido por Hess e colaboradores¹²⁰, em 2011, sugere-se uma associação entre ganhos envolvendo o gene *CLIP2* e carcinomas da tiróide. Neste estudo refere-se ainda, uma relação entre ganhos deste gene com gliomas e cancro colo-rectal. Dada a escassez de estudos realizados com este gene e principalmente com a sua associação ao cancro, pode colocar-se a hipótese deste resultado não ser real. De facto, o painel de sondas utilizado não é um painel comercializado, de modo que a sua optimização poderá ainda não estar concluída. Por outro lado, sabe-se que os processos carcinogénicos estão associados a elevadas taxas de mutação⁸⁰. Como tal, pela técnica de MLPA, a existência de mutações pontuais é o suficiente para que a sonda não hibridize com o DNA complementar de forma correcta e assim se verifique um falso positivo¹⁰⁰. Todavia, devido ao facto de terem sido observadas perdas em outros genes estudados em posições adjacentes a este gene, suspeita-se que efectivamente esta alteração pode corresponder a uma alteração possivelmente relacionada com o CB. De forma a clarificar este ponto, seria interessante aumentar o número de casos estudados e compreender em que medida esta alteração continuaria a fazer-se notar.

3.1.4. Cromossoma 9 – Genes *CDKN2A* e *CDKN2B*

Neste estudo, verificou-se perda do gene *CDKN2A* (9p21) em 42,9% (6/14) dos casos, na quase totalidade das regiões estudadas desse mesmo gene. Quanto ao gene *CDKN2B*, este apresentou perda em cerca de 35,7% (5/14) dos casos. À excepção de um caso, verificou-se simultaneamente perda do gene *CDKN2A* e do gene *CDKN2B*.

Em 2012, Rebouissou e colaboradores⁹⁴ sugeriu a existência de uma ligação estreita entre deleções no gene *CDKN2A* e mutações no gene *FGFR3*. De acordo com este estudo, a combinação destes dois tipos de alterações está relacionada com a progressão para tumores invasivos⁹⁴. O Doente 3 apresenta perda do gene *CDKN2A* e uma mutação no gene *FGFR3* o que poderá então ser sugestivo de um elevado risco de progressão para um tumor invasivo.

O cromossoma 9 é considerado como um dos mais importantes no que diz respeito ao processo de carcinogénese da bexiga⁸². As alterações mais frequentemente descritas neste cromossoma são perdas, sendo que a perda de heterozigotia do braço longo corresponde a uma das primeiras alterações a ocorrer no que diz respeito à progressão tumoral¹²¹. O gene *CDKN2A* codifica duas proteínas supressoras tumorais p16^{INK4a} e a p14^{ARF} que desempenham funções fulcrais no que diz respeito à progressão do ciclo celular e à indução da senescência⁹⁴. Assim, este gene encontra-se frequentemente deletado em casos de CB. Cerca de 40 a 60% dos casos de CB manifestam deleções hemizigóticas e cerca de 10% a 30% manifestam deleções homozigóticas nesta região do cromossoma 9⁹⁴. Em alguns casos, as deleções homozigóticas incluem também o gene vizinho, *CDKN2B*, que codifica a proteína p15^{INK4b} que corresponde a um inibidor do ciclo celular⁹⁴. Neste gene estão também descritas mutações e silenciamento por metilação porém, estes casos são muito raros⁹⁴.

3.1.5. Cromossoma 17 – Genes *AKAP10*, *USP22*, *NOS2*, *ERBB2* e *WSB1*

Nos resultados obtidos para as amostras estudadas, as alterações observadas para os genes localizados no braço curto do cromossoma 17 corresponderam a perdas (*AKAP10* – 17p11.2; *USP22* – 17p11.2). Porém, quanto ao braço longo deste cromossoma, em 3 das 4 regiões estudadas (*NOS2* – 17q11.2; *ERBB2* exão 19 e 28 – 17q12) foram observados ganhos excepto para o gene *WSB1* (17q11.1) em que também foram registadas perdas em 42,9% (6/14) dos casos. Com estes resultados, a indicação de existência especificamente de perdas associadas ao cromossoma 17p e ganhos no cromossoma 17q não se verificou.

O cromossoma 17 está associado à existência de ploidias em amostras de CB de tal forma que o teste UroVysion® inclui sondas específicas para este cromossoma¹¹⁹.

Porém, alguns estudos descrevem a existência de perdas associadas ao braço curto e ganhos para o braço longo do cromossoma 17^{82,121}.

Na literatura são escassos os estudos que envolvem o gene *WSBI*. Este gene é regulado pelo *stress* celular de tal forma que, a sua amplificação e sobre-expressão estão associadas a prognósticos muito favoráveis em casos de neuroblastomas¹²². Na literatura, este gene aparece também associado ao cancro do pâncreas¹²³.

3.1.6. Outras regiões relevantes

Para além das alterações referidas anteriormente, é de salientar também as elevadas frequências de alterações observadas para genes como *PPOX* (1q23.3), *SLC7A9* (19q13.11) e *HSPA13* (21q11.2). Para os genes referidos as frequências de alteração foram: o gene *PPOX* registou ganhos em 35,7% (5/14) dos casos, o gene *SLC7A9* registou ganhos em 28,6% (4/14) e perda em 14,3% (2/14) dos casos e o gene *HSPA13* apresentou ganhos em 42,9% (6/14) dos casos. As sondas de MLPA específicas para estes genes correspondem às sondas referência do painel. De acordo com a técnica de MLPA, não devem ser seleccionadas para sondas controlo regiões que se conheçam como estando associadas a alterações cromossómicas frequentes^{100,124}. Contudo, em cancro a instabilidade cromossómica pode atingir níveis elevados, tornando-se assim difícil escolher regiões geneticamente estáveis. Apesar disso, na literatura descreve-se a existência de uma robustez elevada da técnica de MLPA, de tal forma que o *software* utilizado possibilita a análise das amostras em estudo sem o comprometimento dos resultados, mesmo quando se verificam alterações ao nível das sondas referência^{100,124}. Todavia, a existência de alterações ao nível das sondas referência não corresponde a uma situação ideal. Como referido anteriormente, o painel de sondas utilizado não é comercializado, sendo que esta poderá ser uma das possíveis optimizações a realizar. Na literatura não estão descritas associações directas destes genes com o cancro.

3.2. Análise por MLPA de amostras de DNA extraído de células da bexiga excretadas na urina

Neste estudo foram avaliadas por MLPA 14 biópsias tumorais contudo, apenas as urinas correspondentes a 12 dessas amostras foram avaliadas por esta técnica. As urinas correspondentes aos Doentes 1 e 2 não foram avaliadas por MLPA. Pela realização da

técnica de MLPA em amostras de DNA extraído de células da bexiga excretadas na urina, foram detectadas 48 alterações (28 perdas, 18 ganhos e 2 mutações). As alterações detectadas estão representadas na Figura 20 (A) e as suas frequências absolutas estão representadas na Figura 20 (B). Com este estudo, verificaram-se alterações em todos os casos excepto para as amostras correspondentes aos Doentes 3, 8, 12 e 14.

No que diz respeito às regiões estudadas, foram detectadas alterações (perdas, ganhos ou mutações) em 50,9% das sondas incluídas neste painel. As restantes sondas (49,1%) não apresentaram alterações em nenhum caso. As alterações detectadas (perdas ou ganhos) correspondem aos genes *PPOX*, *MDM4* (exão 8), *FHIT* (exão 9), *ROBO1*, *EPHA3*, *ARL13B*, *CASR* (exão 6), *CDKN2A* (exão 5), *CDKN2A* (exão 3), *CDKN2A* (intrão 1), *CDKN2A* (exão 1), *CDKN2B* (exão 2), *CDKN2B* (exão 1), *PTEN* (exão 1),

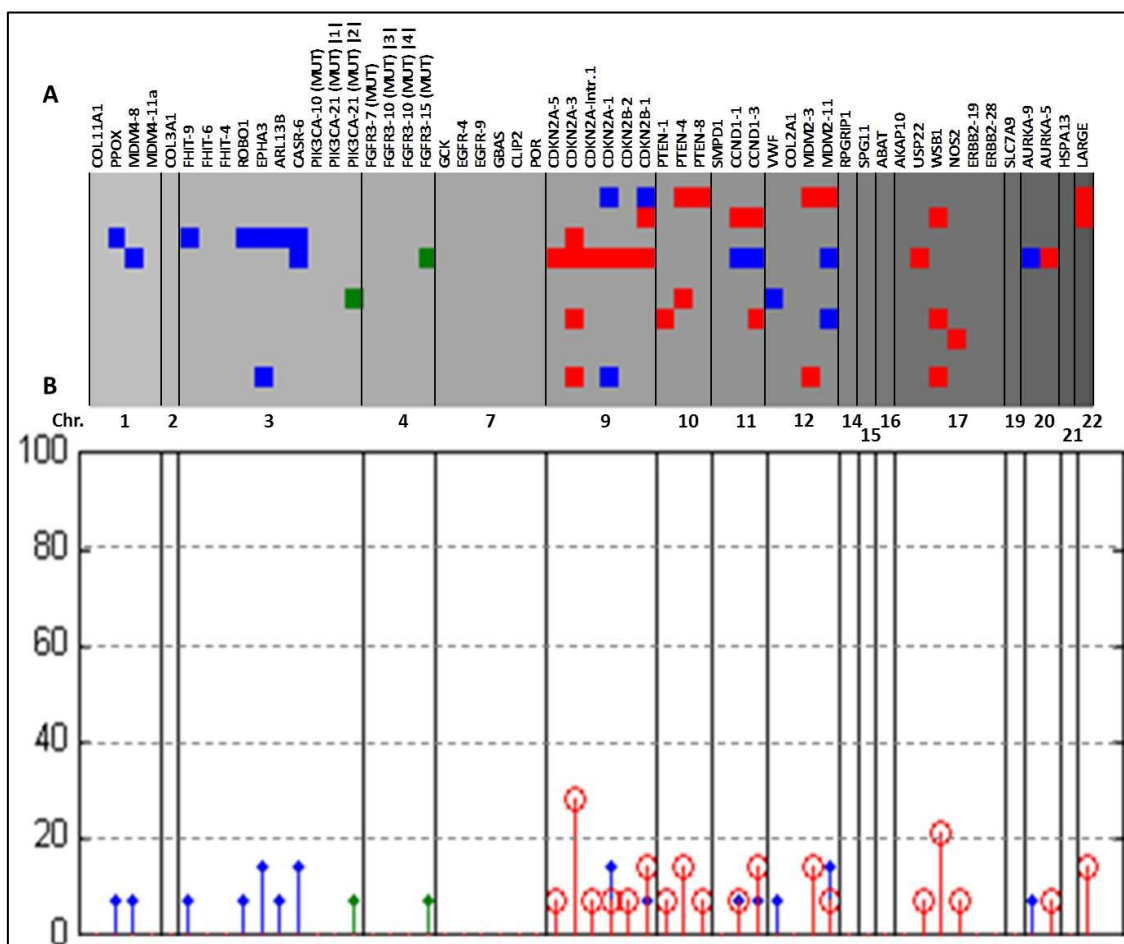


Figura 20: Resultados obtidos por MLPA em amostras de DNA extraídas de células excretadas na urina; **A** – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); **B** - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma.

Legenda: Em cada coluna está representado um gene e, em determinados casos, o exão estudado (ex. *MDM4*-8: gene *MDM4*, exão 8); **Azul** - Ganho; **Vermelho** – Perda; **Verde** – Presença de mutação; **Cinzeno** – Sem alteração; |1| - H1047L; |2| -; |3| - Y373C; |4| - G370C.

PTEN (exão 4), *PTEN* (exão 8), *CCND1* (exão 1), *CCND1* (exão3), *VWF*, *MDM2* (exão 3), *MDM2* (exão 11), *USP22*, *WSB1*, *NOS2*, *AURKA* (exão 9), *AURKA* (exão 5) e *LARGE*. No que diz respeito às mutações, apenas foram detectadas duas e associadas aos genes *PIK3CA* (exão 21 – codão H1047R) e *FGFR3* (exão 15).

As regiões mais frequentemente alteradas correspondem aos cromossomas 9 e 17 respectivamente nos genes *CDKN2A* (exão 3) e *WSB1* como se pode observar no histograma da Figura 20 (B). O gene *CDKN2A* (exão 3) apresentou perda em 33,3% (4/12) dos casos tendo sido também registadas alterações envolvendo os outros exões dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*. O gene *WSB1* apresentou perda em 25% (3/12) dos casos.

3.3. Comparação dos resultado obtidos para o DNA extraído de biópsias tumorais e de urina

Quando se comparam os resultados obtidos para as amostras de DNA extraídas da biópsia tumoral e da urina correspondente, é perceptível que o número de alterações detectadas nas amostras de urina reduz consideravelmente. O facto de serem registadas menos alterações nas amostras provenientes da urina já seria de esperar. Este facto pode ser explicado com base em vários factores: 1) As células da bexiga excretadas na urina provêm da esfoliação celular desse mesmo órgão. Como tal, mesmo na presença de um tumor não é possível seleccionar apenas as células que dele provêm. Numa amostra, entre as células excretadas na urina, temos não só células tumorais mas também células de toda a bexiga e de todas as vias do tracto urinário com que contacta a urina até ser expelida. Apesar de em biópsias tumorais também poder existir contaminação com células normais, na urina esse efeito é muito mais evidente. Segundo a literatura, numa amostra que se pretende estudar por MLPA, é necessária a existência de pelo menos 20 a 50% de células tumorais^{100,124}. 2) A qualidade do DNA que pode nem sempre ser a mais aconselhável, como discutido no ponto 2.

Pela análise da Figura 21, é perceptível que foram detectadas algumas alterações genéticas nas amostras correspondentes às biópsias tumorais que não foram detectadas nas amostras de urina. Por outro lado foram também detectadas alterações nas amostras de urina que não foram detectadas nas biópsias tumorais. Como exemplo, podemos ter as alterações que envolvem o gene *MDM4* (exão 8) e as mutações nos genes *PIK3CA* (exão 21 – codão H1047R) e *FGFR3* (exão 15). Estes factos podem ser explicados pela

existência de contaminações com células normais provenientes de várias regiões da bexiga e também de várias regiões do tracto urinário.

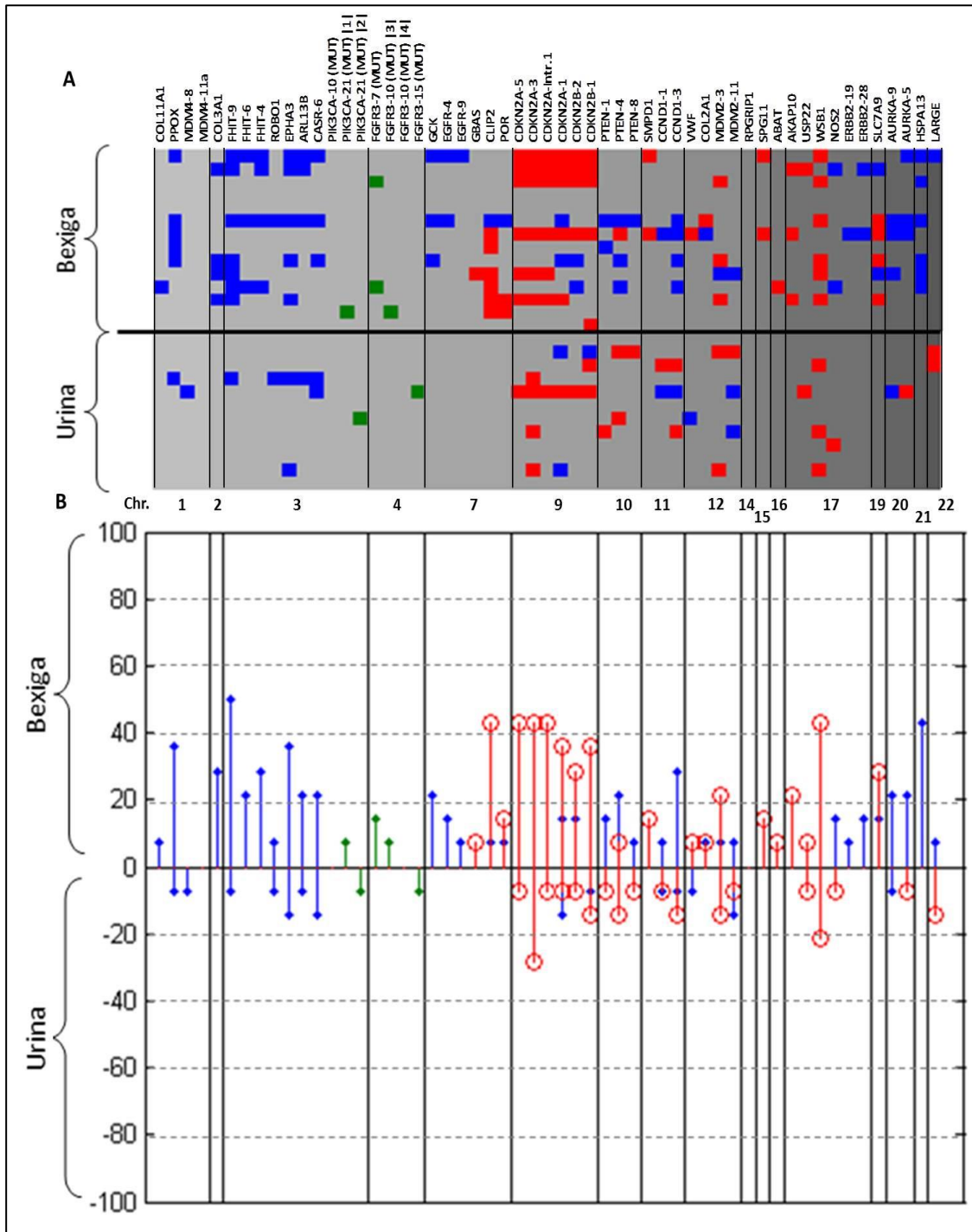


Figura 21: Comparação dos resultados obtidos por MLPA entre amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais e de células excretadas na urina; **A** – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); **B** - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma.

Legenda: Em cada coluna está representado um gene e, em determinados casos, o exão estudado (ex. *MDM4*-8: gene *MDM4*, exão 8); **Azul** - Ganho; **Vermelho** – Perda; **Verde** – Presença de mutação; **Cinzento** – Sem alteração; |1| - H1047L; |2| - H1047R; |3| - Y373C; |4| - G370C.

Neste estudo, pela utilização de DNA extraído de células da urina, foi possível detectar alterações que foram de igual modo detectadas na amostra proveniente da biópsia tumoral. Por exemplo, na biópsia do Doente 3 verificou-se que as 7 regiões estudadas (em relação ao número de cópias) no cromossoma 3 apresentavam ganho. Na urina do mesmo doente foi possível detectar as mesmas alterações em 5 das 7 regiões. O mesmo se verifica no caso do Doente 7. Neste doente, na biópsia tumoral foi detectada perda para a totalidade das regiões estudadas envolvendo o cromossoma 9. Na urina foram também detectadas estas alterações.

Pela análise do histograma da Figura 21 (B) é perceptível que as regiões correspondentes aos cromossomas 3, 9 e 17 são as regiões em que se observa uma maior frequência e correspondência entre as alterações detectadas na biópsia e na urina. A Tabela 12 mostra os genes para os quais foi observada significância estatística pela comparação entre os pares concordantes relativos às biópsias tumorais e às urinas. Assim, observa-se que os genes *CDKN2B* e *AURKA* (exão 5) apresentam uma concordância considerável, os genes *MDM2* (exão 11) e *NOS2* apresentam uma concordância moderada, o gene *CCND1* (exão 1) apresenta uma concordância substancial e os genes *ROBO1* e *ARL13B* apresentam um excelente grau de concordância. Para os restantes genes estudados o grau de concordância verificado não foi significativo.

Tabela 12: Genes que apresentaram relevância estatística pela realização de uma análise de kappa de Cohen entre os pares concordante da biópsia tumoral e da urina.

Gene	Posição Chr.	k	p
<i>ROBO1</i>	3p12.3	1,000	0,001
<i>ARL13B</i>	3q11.1	1,000	0,001
<i>CDKN2B</i>	9p21	0,333	0,040
<i>CCND1 - 1</i>	11q13.3	0,636	0,002
<i>MDM2 - 11</i>	12q15	0,442	0,029
<i>NOS2</i>	17q11.2	0,478	0,001
<i>AURKA - 5</i>	20q13.2	0,294	0,020

(A análise dos resultados estatísticos foi realizada de acordo com o descrito por Landis e Koch¹¹² em 1977. De acordo com os referidos autores, para os valores do teste kappa considera-se que: 0 – ausência de concordância; 0 – 0,20 – concordância ligeira; 0,21 – 0,40 – concordância considerável; 0,41 – 0,60 – concordância moderada; 0,61 – 0,80 – concordância substancial; 0,8 – 1 – excelente concordância)

Com estes resultados é possível afirmar que a utilização da urina como intermediário do estudo de tumores da bexiga é uma estratégia promissora de tal forma que, apesar do reduzido número de casos estudados, foi possível obter resultados com significância estatística. Por outro lado, a técnica de MLPA, tal como já verificado para o estudo de amostras provenientes de biópsias tumorais, também se apresenta como uma técnica sensível mesmo no estudo de amostras provenientes de urina.

4. Alterações genéticas e do perfil de metilação detectadas pela técnica de MS-MLPA

4.1. Análise dos resultados obtidos por MS-MLPA – Número de cópias

Por MS-MLPA foram estudadas apenas as amostras de DNA extraído directamente da biópsia tumoral. Neste estudo, foram avaliadas as 14 amostras tumorais sendo que de forma geral foram detectadas 121 alterações por esta técnica. Entre estas alterações temos 57 ganhos e 64 perdas de material genético, representadas na Figura 22 (A). Por esta técnica foram detectadas alterações em todos os doentes à excepção do Doente 4 que não registou qualquer alteração.

Com este painel de sondas de MS-MLPA (ME002), em relação ao número de cópias, as regiões estudadas localizam-se nos cromossomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20. Pela utilização do painel de sondas referido foram estudadas 41 regiões específicas do genoma que correspondem a 38 genes. Os genes estudados estão listadas e organizadas de acordo com a localização no cromossoma (braço, região, banda e sub-banda) no anexo IV. Em alguns casos foram estudados vários exões do mesmo gene. Pela técnica de MS-MLPA foram detectadas alterações genéticas (ganhos ou perdas) em todas as regiões estudadas, à excepção dos genes *ESR1*, *PAX6*, *PAH* e *TSC2*. Na Figura 22 (A) estão representadas todas as alterações observadas e no histograma da Figura 22 (B) estão representadas as frequências absolutas das alterações registadas, por cromossoma. Pela análise do histograma da Figura 22 (B) observa-se que as maiores frequências de alterações (superiores a 30%) foram registadas para os genes: *MSH6* – perda em 42,9% (6/14) dos casos; *VHL* – ganho em 35,7% (5/14) dos casos; *GSTP1* – perda em 35,7% (5/14) dos casos; *TP53* – perda em 7,1% (1/14) e ganho em 57,1% (8/14) dos casos; *GATA5* – ganho em 57,1% (8/14) dos casos.

Utilizando o painel de sondas ME002, foi possível verificar a existência de resultados que sugerem a existência de ganhos ou perdas de material genético associadas a alguns braços cromossómicos. Por exemplo, as alterações observadas nas sondas correspondentes ao cromossoma 3 apresentaram maioritariamente ganho como se pode verificar na Figura 22. Deste modo, tal como já discutido nos resultados referentes à técnica de MLPA, sugere-se a existência predominantemente de ganhos de material genético para este cromossoma. Também no cromossoma 11 parece haver

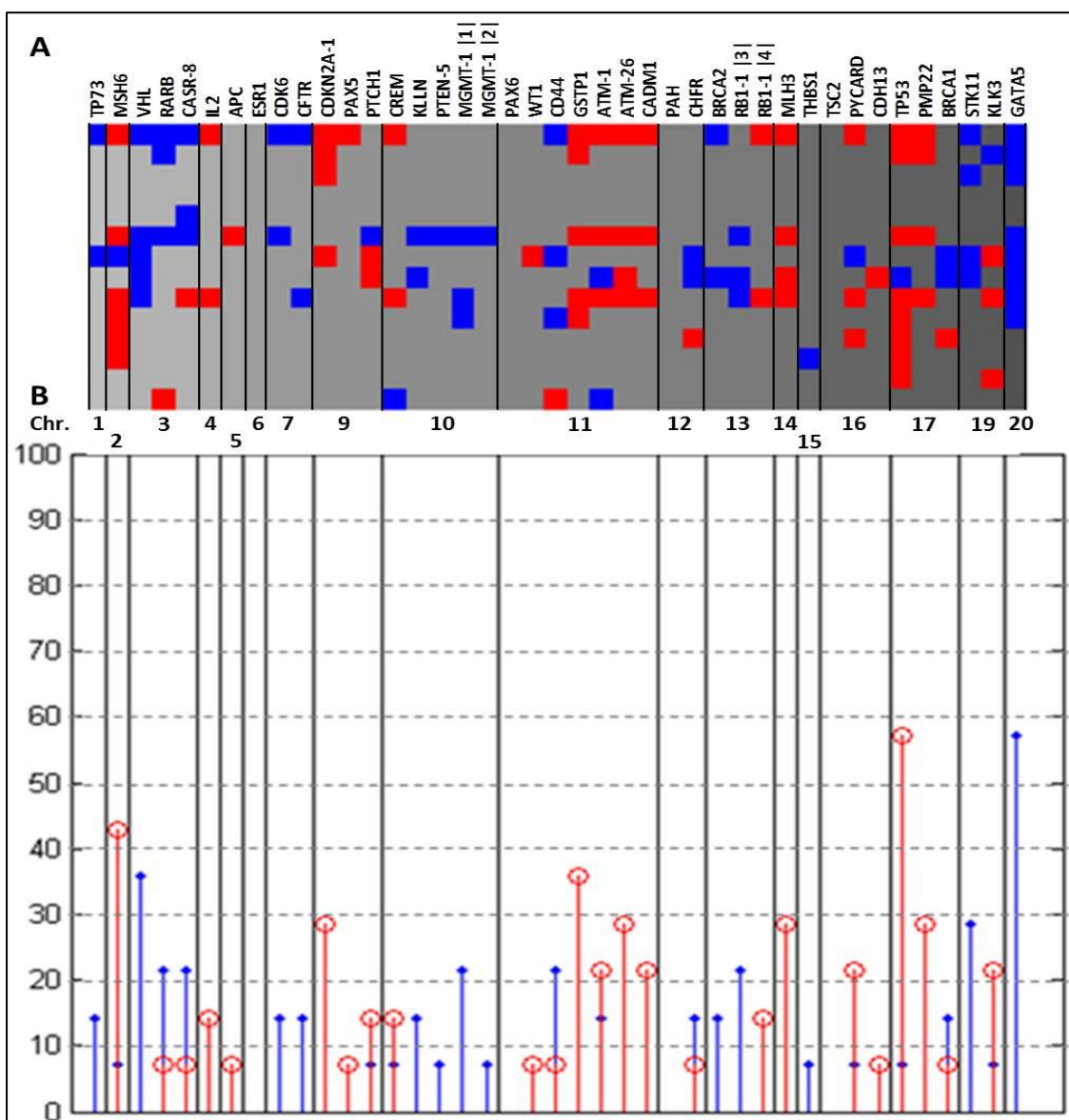


Figura 22: Resultados obtidos por MS-MLPA (número de cópias) para as amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais; **A** – Figura representativa das alterações detectadas, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal); **B** - Histograma representativo das frequências absolutas correspondentes, por cromossoma.

Legenda: Em cada coluna está representado um gene e, em determinados casos, o exão estudado (ex. CASR-8: gene CASR, exão 8) **Azul** - Ganho; **Vermelho** – Perda; **Cinzeno** – Sem alteração; |1| - 05670-L05146; |2| - 18346-L23286; |3| - 02734-L23112; |4| - 04502-L02199.

evidências da tendência de perda do braço longo deste cromossoma. Os genes *GSTP1*, *ATM* (exão 1), *ATM* (exão 26) e *CADMI* localizados no braço longo do cromossoma 11 apresentam maioritariamente perda, como se pode observar na Figura 22. Contudo, segundo a literatura, para inferir sobre a perda ou ganho total ou parcial de um cromossoma por técnicas como o MLPA ou MS-MLPA é necessário o estudo de um elevado número de genes¹⁰⁰. Neste caso o número de regiões estudadas por cromossoma é reduzido sendo assim difícil inferir com certeza a existência de alterações totais ou parciais dos cromossomas.

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos em amostras de CB utilizando a técnica de MS-MLPA^{18,91,113}. Todavia, de um modo geral os resultados obtidos em relação ao estudo do número de cópias não são discutidos. Este tipo de estudos tem sido igualmente realizado em amostras de DNA extraídas de urina^{32,98}. Nesses casos sugere-se que a avaliação do número de cópias não é realizada devido não só à má qualidade do DNA bem como devido à excessiva contaminação com células normais¹¹³. De seguida, será apenas discutido o gene com maior frequência de alteração neste estudo, por MS-MLPA (*TP53*).

4.1.1. Cromossoma 17 – Gene *TP53*

Para as regiões estudadas do braço curto do cromossoma 17 (genes *TP53* e *PMP22*) foram observadas maioritariamente perdas de material genético. Porém, neste cromossoma é de salientar especificamente o gene *TP53*. Este gene foi o gene em que se apresentou uma maior frequência de alteração. Neste estudo, a taxa de alteração do gene *TP53* foi de 64,2% (9/14) dos casos sendo 57,1% (8/14) correspondente a perdas e 7,1% (1/14) correspondente a ganhos de material genético.

O gene *TP53* (17p13) é um GST que desempenha uma função fulcral não só na regulação do ciclo celular mas também na regulação da apoptose, dos mecanismos de reparação celular bem como no processo de metastização tumoral¹²⁵⁻¹²⁷. Este gene está fortemente associado ao cancro da bexiga sendo característico essencialmente de tumores invasivos^{89,126,128}. Por exemplo, em tumores do tipo T2, o gene *TP53* está alterado em mais de 40% dos casos⁸⁹. A principal alteração descrita neste gene em amostras de cancro da bexiga é a mutação que em cerca de 80% dos casos é do tipo *missense*^{89,125}. Todavia, associado a este gene são também observadas deleções⁸⁹. Em qualquer uma das situações verifica-se a perda de função da proteína p53 e

consequentemente uma desregulação catastrófica dos mecanismos de controlo do ciclo celular, morte celular e reparação do DNA¹²⁸.

Neste estudo, como já foi referido, a taxa de perdas associadas a este gene foi muito elevada. Porém, com o painel de sondas de MS-MLPA utilizado (ME002) não é possível detectar mutações nos genes. Está descrito para esta técnica que, a existência de mutações pontuais na região do DNA complementar à sonda pode induzir a ocorrência de falsos positivos^{100,102}. Numa situação deste tipo, a complementariedade entre o DNA alvo e a sonda não é perfeita de tal forma que, aquando da hibridização, esta não irá ocorrer de forma perfeita e assim surgirá um resultado como se existisse uma perda de material genético naquela região^{100,102}. A confirmação de resultados como este por outras técnicas é essencial de forma a excluir a existência de possíveis mutações ao invés de perdas de material genético. Todavia, em qualquer das situações verifica-se uma desregulação desta via de sinalização e consequentemente dos mecanismos que controla. Este gene é um importante factor a ter em consideração na avaliação da progressão tumoral e do prognóstico de cada doente^{126,128}.

4.2. Análise dos resultados obtidos por MS-MLPA - Metilação

Com a utilização do painel de sondas ME002 (MS-MLPA) neste estudo foi possível inferir sobre o estado de metilação de alguns genes. De modo geral, este painel de sondas permitiu avaliar o estado de metilação de 27 regiões diferentes do genoma. As 14 amostras tumorais foram todas estudadas por esta técnica, tendo sido detectadas 41 alterações no padrão de metilação (34 regiões metiladas, 7 regiões hipermetiladas). De todos os doentes estudados, apenas os Doentes 4, 11 e 14 não apresentaram qualquer alteração. Os genes em que foram detectadas alterações no estado de metilação foram: *TP73*, *MSH6*, *PAX5*, *KLLN*, *MGMT* (exão 1 - 05670-L05146), *MGMT* (exão 1 - 18346-L23286), *PAX6*, *WT1*, *CD44*, *GSTP1*, *THBS1*, *CDH13* e *GATA5*, como representado na Figura 23. Estas alterações correspondem a genes localizados nos cromossomas 1, 2, 9, 10, 11, 15, 16 e 20. Os genes em que se verificou um maior número de alterações no padrão de metilação foram: *MSH6* alterado em 71,4% (10/14) dos casos (metilação em 57,1% (8/14) e hipermetilação em 14,3% (2/14) dos casos); *PAX5* alterado em 57,1% (8/14) dos casos (metilado em 50% (7/14) e hipermetilado em 7,1% (1/14) dos casos); *KLLN* alterado em 35,7% (5/14) dos casos (metilado em 35,7% (5/14) e hipermetilado em 0% (0/14) dos casos).

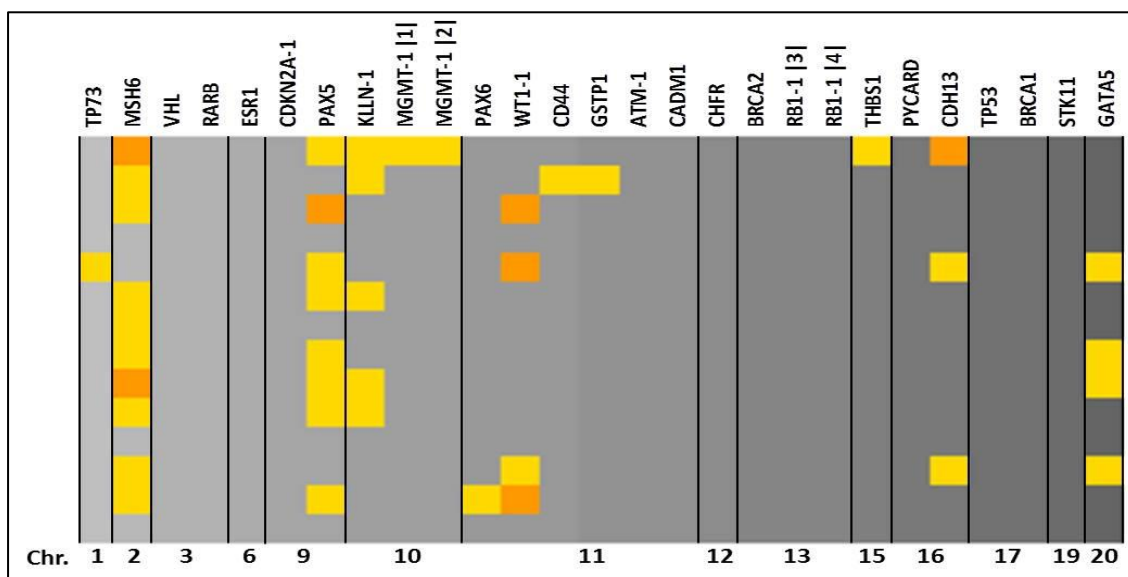


Figura 23: Resultados obtidos por MS-MLPA (metilação) para as amostras de DNA extraídas de biópsias tumorais, por cromossoma (vertical) e por paciente (horizontal).

Legenda: Em cada coluna está representado um gene e, em determinados casos, o exão estudado (ex. *CDKN2A-1*: gene *CDKN2A*, exão 1) **Amarelo** - Metilação; **Laranja** - Hipermetilação; **Cinzento** - Sem alteração; |1| - 05670-L05146; |2| - 18346-L23286; |3| - 02734-L23112; |4| - 04502-L02199

Têm sido desenvolvidos vários estudos com o objectivo de avaliar o estado de metilação de genes associados ao CB. Em 2012, Zuiverloon e colaboradores¹⁸ com o mesmo painel de sondas ME002 em amostras provenientes de biópsias tumorais, descreveram os genes *TP53*, *MGMT*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *ESR1*, *MSH6*, *RARB* e *CD44* como sendo os mais metilados em amostras de CB¹⁸. Porém, Agundez e colaboradores⁹², em 2011, descreveram os genes *STK11*, *MSH6*, *BRCA1*, *PAX5*, *MGMT*, *CDH13* e *IGSF4* como os mais frequentemente metilados em tumores do tipo T1,G3⁹². Existem vários factores que podem explicar a existência de algumas diferenças entre estes estudos. Factores como a idade, a presença de infecções no trato urinário, a contaminação com células normais, a presença de tumores multifocais bem como o próprio estadio e grau tumoral podem induzir variações nos padrões de metilação deste tipo de células^{92,129}.

De seguida serão discutidos os genes que apresentaram maior frequência de metilação neste trabalho (*MSH6*, *PAX5*, *KLLN*).

4.2.1. Cromossoma 2 – Gene *MSH6*

O gene *MSH6* (2p16.3), em relação ao número de cópias apresentou perda em 42,9% (6/14) dos casos estudados. Para além disto, importa salientar que em relação ao

padrão de metilação, este apresentou alterações no padrão de metilação em 71,4% (10/14) dos casos. Ao comparar estes resultados percebemos que 5 dos 6 casos que apresentaram perda deste gene, possuem metilação elevada. Ou seja, para além da perda de material genético, que levaria a uma diminuição da sua expressão, este ainda se apresenta metilado o que poderá levar a uma repressão total da expressão do gene. Por outro lado, dos 14 doentes estudados, um deles apresentou ganho deste gene. Porém, em simultâneo foi verificada a metilação do gene o que poderá servir como um mecanismo compensatório do ganho de material genético observado. Em relação a este gene, foram ainda detectados dois casos em que o número de cópias se apresenta normal mas o gene encontra-se metilado. Este facto sugere igualmente um silenciamento do gene.

O gene *MSH6* desempenha uma função essencial no mecanismo de reparação de DNA do tipo *mismatch*¹³⁰. Este gene é um dos homólogos da proteína mutS que regula o reconhecimento de erros na cadeia de DNA¹³⁰. Genes associados a este processo apresentam frequentemente perda de função. Esta perda de função pode estar associada à perda do gene ou à ocorrência de mutações¹³⁰. A desregulação deste gene está associada ao aumento da instabilidade genética¹³¹. Em relação ao CB, este gene apresenta-se frequentemente associado a elevados níveis de metilação^{18,92}.

4.2.2. Cromossoma 9 – Gene *PAX5*

Neste estudo, o gene *PAX5* (9p13.2) apresentou alterações em apenas 7,1% (1/14) dos casos (perda de material genético). Em relação ao padrão de metilação, este gene apresentou uma metilação excessiva em 57,1% (8/14) dos casos (metilado em 50% (7/14) e hipermetilado em 7,1% (1/14) dos casos). Deste modo, sugere-se o silenciamento deste gene em vez da sobre-expressão tal como descrito na literatura.

O gene *PAX5* é considerado um oncogene em que, de acordo com a literatura, a sobre-expressão e o aumento do número de cópias são frequentes em amostras de CB¹³². Porém, são também reportados casos de perda deste gene¹³². Em estudos de metilação, este gene apresenta-se frequentemente metilado em amostras de CB^{18,92}. A sua associação com o processo de carcinogénese da bexiga ainda não está perfeitamente clarificada, todavia sabe-se que intervém na via da proteína supressora tumoral p53 ou na via da proteína anti-apoptótica bcl-2¹³².

4.2.3. Cromossoma 10 – Gene *KLLN*

Neste estudo, em relação ao número de cópias, o gene *KLLN* (10q23.31) apenas apresentou ganhos em 2 doentes (Doentes 6 e 8). Por outro lado, em relação ao nível de metilação, este gene apresentou-se metilado em 35,7% (5/14) dos casos. O Doente 6 para além do ganho do número de cópias apresentou também metilação o que pode sugerir um silenciamento do gene. Porém, isto não se verificou para o Doente 8. Este doente apresenta aumento do número de cópias do gene mas sem qualquer alteração no padrão de metilação. Em 3 dos 14 casos estudados não foi detectada qualquer alteração no número de cópias mas verifica-se efectivamente a existência de metilação no gene. Tal como no caso do Doente 6, sugere-se uma possível diminuição da expressão do gene.

O gene *KLLN* codifica uma proteína nuclear de 20 kDa que é necessária para a indução da apoptose pela via p53¹³³. Nos últimos anos, este gene tem vindo a ser descrito como frequentemente metilado em alguns tipos de cancro, como o cancro renal e da mama¹³³. A sua relação com neoplasias da bexiga não está bem clara.

Com a técnica de MS-MLPA foi possível identificar padrões de alterações frequentes entre as amostras estudadas, quer no caso do estudo do número de cópias quer no caso da avaliação da metilação. Apesar de na literatura, de uma forma geral, os resultados referentes ao número de cópias não serem discutidos, neste estudo foi possível obter resultados coerentes para ambas as abordagens. A técnica de MS-MLPA mostrou-se assim uma técnica fiável e robusta no estudo de alterações em amostras de CB.

5. Alterações genómicas detectadas pela técnica de aCGH

5.1. Análise por aCGH de DNA extraído de biópsias tumorais

Das 14 amostras tumorais incluídas no estudo, apenas 13 foram avaliadas por aCGH. Nestas amostras foram detectadas 2915 alterações entre perdas e ganhos. Nas Figuras 25, 26, 27 e 28 podem observar-se as alterações obtidas para os casos estudados por aCGH. De um modo geral, as alterações mais frequentemente observadas foram perdas nos cromossomas 1p, 16, 17, 19, 20 e 22q e ganhos nos cromossomas 5p, 13q e 20q, como se pode observar na Figura 24. Contudo, estas alterações apenas

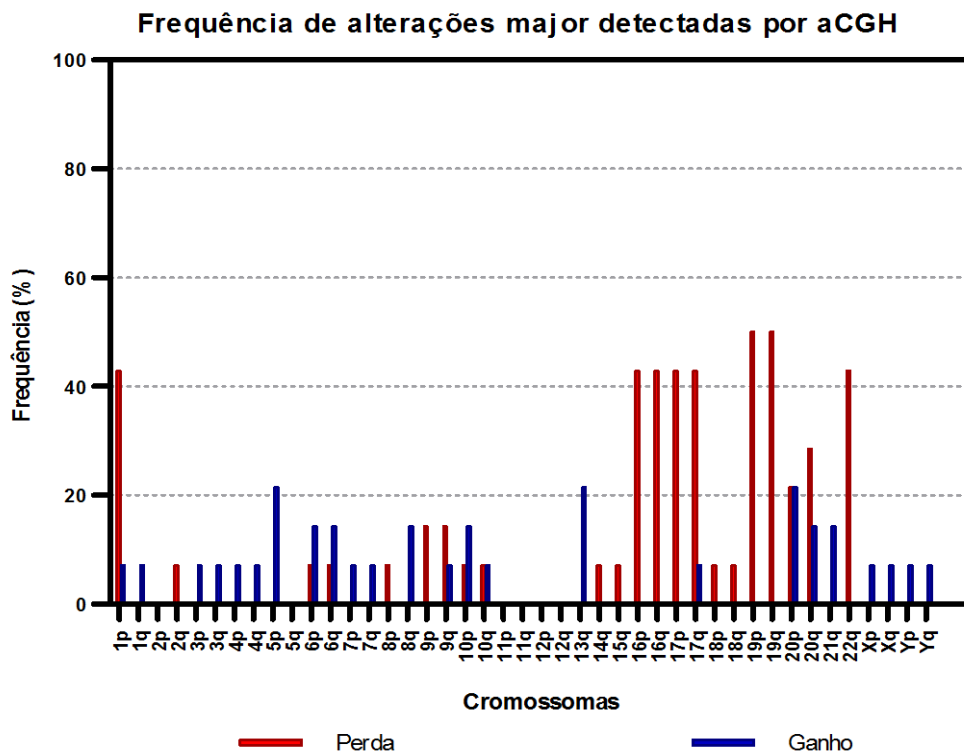


Figura 24: Representação da frequência de casos que apresentam perda total ou parcial dos braços curto e longo dos cromossomas

correspondem aos casos em que se verifica perda ou ganho total ou parcial dos braços completos dos cromossomas.

Pela observação das Figuras 25, 26, 27 e 28 verifica-se a existência de um elevado número de alterações de tamanho muito reduzido, o que dificulta a análise destes casos. Este elevado número de alterações de tamanho reduzido pode ser explicado com base em vários factores: 1) Existência de CNV's (variações do número de cópias) benignas variáveis entre indivíduos. 2) As amostras tumorais estudadas foram cruzadas com DNAs controlo (comercializados pela *Agilent*®) e não com amostras da mesma origem. Os DNAs controlo comercializados pela *Agilent*®, correspondem a DNA extraído de células sanguíneas. A possibilidade de utilizar amostras de DNA controlo com origem no mesmo tipo de tecido das biópsias tumorais é problemática, uma vez que a recolha de tecido tumoral e não tumoral da bexiga do mesmo doente é um processo clínico complexo. Numa situação ideal, o cruzamento dos DNAs na técnica de aCGH deveria ser efectuada entre tecido tumoral e o não tumoral do mesmo paciente. Na impossibilidade de adoptar este procedimento poderiam ter sido utilizados os mesmos controlos que foram utilizados nas técnicas de MLPA e MS-MLPA, porém isso

implicaria a realização de uma validação dos mesmos por esta técnica. Não se optou por este procedimento visto que a validação de controlos para a sua utilização nesta técnica é um procedimento laborioso e dispendioso, dado o desconhecimento das alterações que os possíveis controlos poderão ter. Assim optou-se pela utilização dos controlos comercializados pela *Agilent*®, com alterações já conhecidas, apesar das desvantagens referidas. 3) A utilização de métodos de extracção de DNA diferentes pode ser problemática devido à disparidade das concentrações de sais associada a cada método serem diferentes.

A análise dos resultados dos doentes estudados foi realizada de acordo com o estadió TNM e o respectivo grau. Assim, Na Figura 25 estão representadas as alterações correspondentes a tumores do tipo Ta,G1 (Doentes 3 e 11), na Figura 26 estão representados os tumores do tipo T1,G1 (Doentes 5, 9, 12 e 13), a Figura 27 corresponde aos tumores do tipo T1,G2 (Doentes 1, 6, 7 e 8) e a Figura 28 representa as alterações encontradas nos tumores T1,G3 (Doente 2 e 4) e o único tumor invasivo T3,G3 (Doente 10). Neste estudo, apenas o DNA referente à biópsia tumoral do Doente 17 não foi avaliada por aCGH.

Na Figura 25 apesar de estarem representados dois tumores Ta,G1 o padrão de alterações é diferente. Por aCGH, o Doente 3 apresenta apenas 16 alterações enquanto que o Doente 11 apresenta cerca de 340 alterações. De acordo com a literatura, a instabilidade genómica no cancro da bexiga aumenta progressivamente com o estadió e grau tumoral⁸². Contudo, devido ao facto de estarmos na presença de dois tumores iniciais de desenvolvimento, não seria de esperar uma discrepância tão acentuada entre eles. De um modo geral, o padrão de alterações correspondente ao Doente 11 (Figura 25) assemelha-se muito mais com o padrão de alterações verificado para os tumores do tipo T1,G1 (Figura 26). Com base neste resultado, poderia sugerir-se que geneticamente o tumor do Doente 11 apresenta características efectivamente mais próximas a tumores do tipo T1,G1 do que dos tumores Ta,G1.

Para os tumores do tipo T1,G1 (Figura 26) observa-se a existência de um padrão muito bem demarcado entre essencialmente 3 dos quatro casos. Os tumores referentes aos Doentes 9, 12 e 13 apresentam uma média de 270 alterações enquanto para o Doente 5 foram detectadas apenas 22 alterações. Apesar do reduzido número de alterações detectadas para o Doente 5, estas são sobreponíveis com as detectadas para os outros 3 doentes. Exemplos disso são as alterações observadas nos cromossomas 3 e 7. O Doente 5 apresenta 4 alterações no cromossoma 3 (3p21.31, 3p14.3, 3q23, 3q29) com

um tamanho variável entre os 1,3 e os 3,1 Mb e que são de igual modo observadas para os Doentes 9, 12 e 13 e com tamanhos muito aproximados. Para o cromossoma 7 verifica-se a mesma situação ou seja, o Doente 5 apresenta três alterações das quais duas (7q11.21-q11.22, 7q11.22-q21.11), com aproximadamente 3 e 6 Mb respectivamente, são perfeitamente coincidentes com as alterações registadas para os restantes casos. No caso dos Doentes 9, 12 e 13 a reprodutibilidade da quase totalidade das alterações observadas é assinalável, contudo é igualmente de salientar o facto dos cromossomas 16, 17, 19 e 22 apresentarem maioritariamente perda da totalidade do cromossoma. Nos resultados referentes a este estadio e grau é de igual modo de salientar o facto de que a grande maioria das alterações encontradas neste estadio e grau (T1,G1) corresponderem a perdas. Curiosamente, nestes quatro casos apenas foram registadas 18 alterações correspondentes a ganhos.

Nos tumores do estadio T1,G2 (Figura 27) observa-se que, apesar de o número de alterações ser semelhante entre os quatro casos, existe uma elevada instabilidade cromossómica, como ganhos nos cromossomas 3, 5p, 8q, 13q, 21q e Y e perdas no cromossoma 19, sem que se note a homogeneidade dos resultados observados nos tumores do tipo T1,G1 (Figura 26). Em termos de progressão de tumores do tipo T1,G1 para tumores T1,G2 verifica-se uma grande variação de alterações difíceis de caracterizar.

Para os tumores do tipo T1,G3 (Figura 28) (Doentes 2 e 4) verificou-se uma diminuição acentuada do número de alterações detectadas por aCGH. De acordo com a literatura, sendo estes tumores muito próximos de tumores invasivos, deveriam apresentar uma instabilidade cromossómica superior aos restantes, principalmente em relação aos tumores Ta,G1⁸². Porém isto não se verifica, o que é observável é que para os Doentes 2 e 4 o número de alterações diminuiu bruscamente em relação aos últimos dois estadios e graus referidos. Entre estes dois casos não se observam regiões com uma elevada similaridade. No entanto, as alterações poderão ser mascaradas pelo grau de mosaïcismo presente na amostra.

Entre os casos estudados por aCGH encontra-se ainda um tumor altamente invasivo (T3,G3) (Doente 10). Neste caso, verificou-se um maior grau de instabilidade cromossómica do que nos casos anteriores (Doentes 2 e 4). Este caso foi o único estudado deste estadio, não tendo assim qualquer termo de comparação. Todavia, para alguns cromossomas verifica-se um elevado grau de semelhança entre este tumor e o padrão de alterações verificado para os tumores do tipo T1,G1. Como exemplos temos

os cromossomas 1p, 16, 17, 19 e 22 em que o padrão de alterações é muito semelhante, ou seja verifica-se perda parcial destes cromossomas em ambos os casos. De acordo com a literatura, as alterações referidas anteriormente para o Doente 10) não correspondem, na totalidade, às alterações mais frequentes em casos de CB. Para o cromossoma 1 está efectivamente descrito a perda do braço curto do cromossoma sendo que esta alteração aparece mais associada a tumores invasivos, tal como ganhos do cromossoma 20q¹³⁴. No que diz respeito ao cromossoma 17, por aCGH verificou-se uma elevada taxa de perda ou maioritariamente perda da totalidade do cromossoma, porém na literatura sugere-se que este está frequentemente associado a perdas do braço curto e ganhos no braço longo^{88,134}. A frequência de perdas dos cromossomas 16 e 19 rondou os 40 a 50%, todavia na literatura, estes cromossomas não estão descritos como fortemente associados a esta neoplasia. Mais especificamente, sugere-se que os braços curtos destes dois cromossomas apresentam um elevado grau de estabilidade genética de tal forma que a taxa de alteração é reduzida¹³⁵. Quanto aos cromossomas 20 e 22q, também não estão descritas alterações muito frequentes, contudo para o cromossoma 20q quanto à presença de perdas ou ganhos não há consenso^{5,135}. Todavia, de acordo com um estudo desenvolvido por Lindgren e colaboradores⁸², em 2012, que envolveu o estudo de 146 casos de CB por aCGH, foi reportada uma elevada frequência de ganhos para o cromossoma 20 e perdas para o braço longo do cromossoma 22q⁸².

É de salientar o ganho do braço longo do cromossoma 13, em três dos quatro casos de tumores do tipo T1,G2 (Figura 27). Esta alteração não foi encontrada em mais nenhum tumor de qualquer outro estadio e grau. Assim, esta será uma alteração que será interessante avaliar futuramente num estudo que envolvesse mais doentes deste estadio e grau. Segundo a literatura, este cromossoma apresenta-se frequentemente deletado em amostras de CB. Ganhos no cromossoma 13 estão reportados em outros tipos de cancro, como por exemplo no cancro coloretal¹³⁶. O braço curto do cromossoma 5 é também uma região que apenas se apresenta alterada nos doentes portadores de tumores do tipo T1,G2. O braço curto do cromossoma 5 apresenta ganho em três dos quatro casos deste estadio e grau. Assim, tal como na alteração anterior, seria interessante perceber até que ponto esta alteração continuava a ser observada caso se aumentasse o número de doentes estudados. A grande diferença desta alteração (cromossoma 5) para a alteração anterior (cromossoma 13) é que a alteração que envolve o cromossoma 5 está descrita na literatura. Segundo vários autores, o cromossoma 5 apresenta frequentemente ganhos do braço curto e perdas do braço longo^{5,82,134}. Estas alterações são de tal modo evidentes

que estão descritas como associadas a uma das principais vias de carcinogénese da bexiga⁸². Ganhos do braço curto do cromossoma 5 estão ainda descritos como associados a tumores invasivos e de alto grau, ou seja estão relacionados com a agressividade tumoral⁸². No nosso caso, verificou-se uma frequência elevada de ganhos do braço curto do cromossoma 5. No braço longo, apesar de não se observar uma perda do braço completo, verifica-se a perda de regiões muito específicas e que são sobreponíveis entre os diferentes casos.



Figura 25: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo Ta, G1. À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.

— Doente 3 — Doente 11

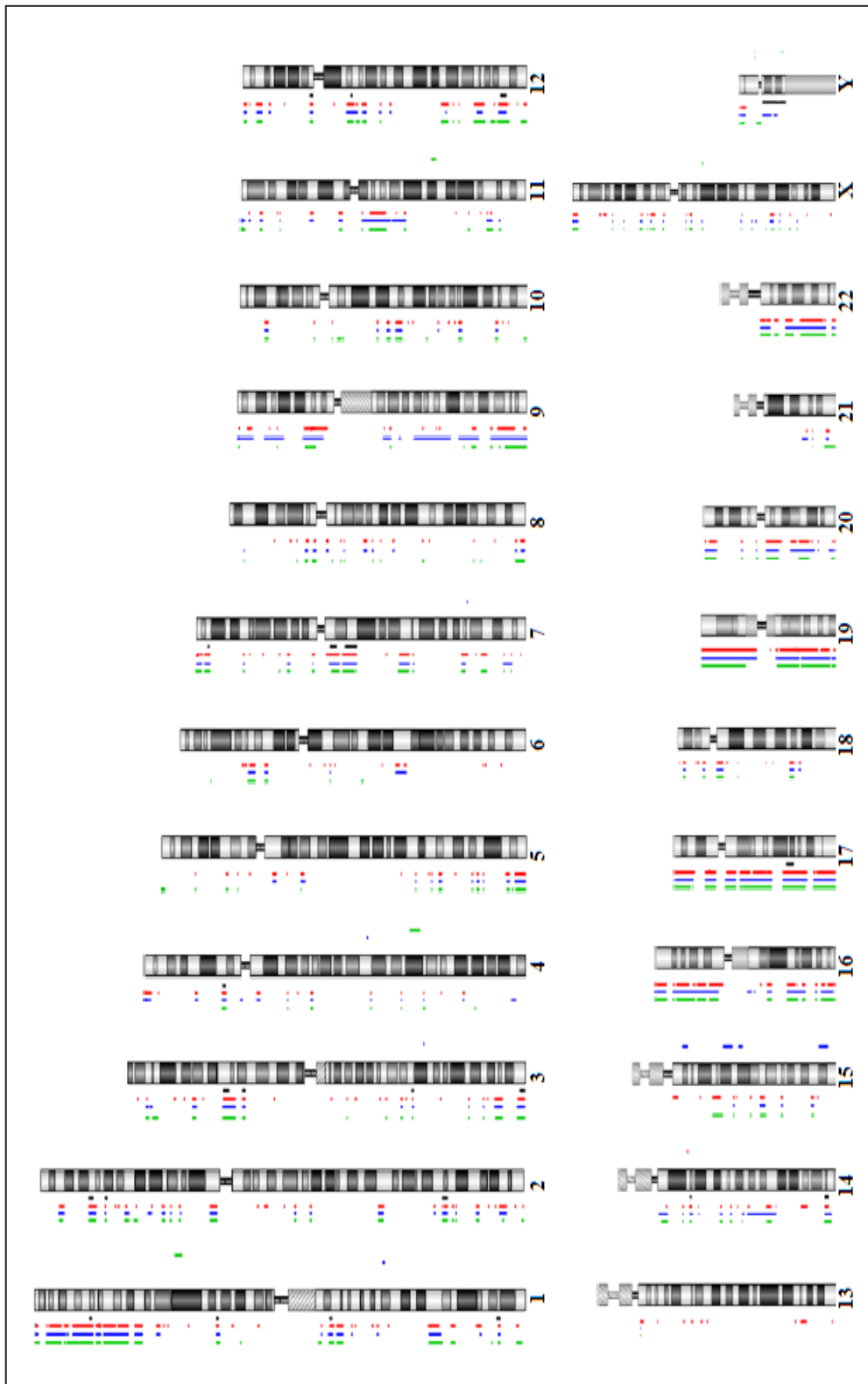


Figura 26: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo T1, G1. À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.



Figura 27: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo T1, G2. À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.

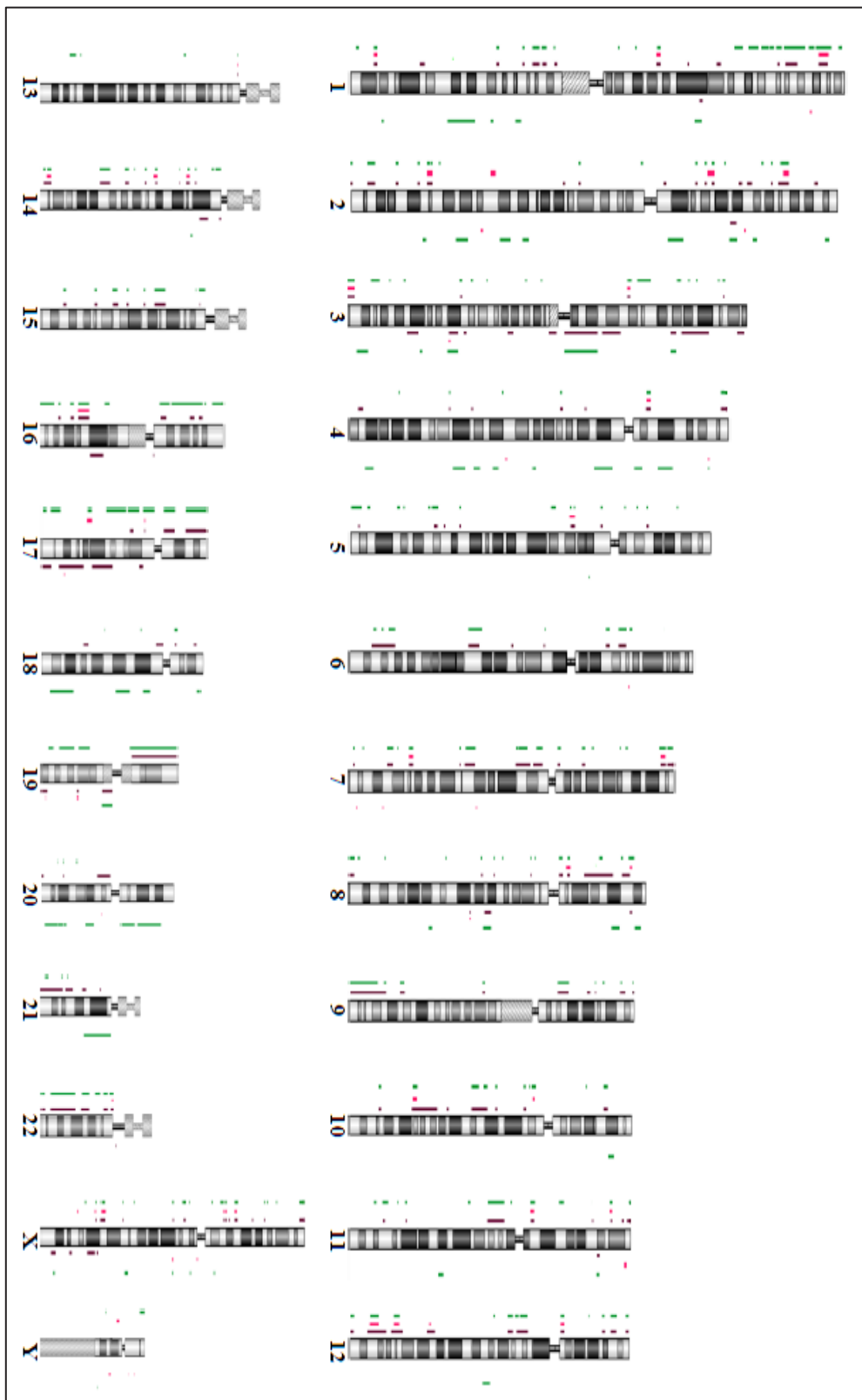


Figura 28: Ideograma com a representação das alterações detectadas por aCGH para os doentes portadores de tumores do tipo T1, G3 (Doentes 2 e 4) e do tipo T3, G3 (Doente 10). À esquerda do cromossoma representação de perdas e à direita representação de ganhos de material genético verificadas.

5.1.1. Discussão dos genes e circuitos de carcinogénese do cancro da bexiga

Nos últimos anos, a investigação relacionada com o CB tem sido alvo de importantes avanços no que diz respeito ao estudo das vias metabólicas mais envolvidas no processo de carcinogénese. Vários estudos já sugerem diferentes vias metabólicas como sendo preponderantes neste processo^{13,85,137}. Em 2012, Lindgren e colaboradores⁸² descreveram a existência de dois circuitos essenciais associados ao processo de carcinogénese da bexiga e sugeriram a existência de mais dois, como representado na Tabela 13.

Tabela 13: Representação dos diferentes circuitos, descritos e sugeridos, associados ao CB com indicação das alterações que os caracterizam⁸².

Circuitos descritos	Alterações
FGFR3/CCND1	Perda – 9q, <i>CDKN2A</i> ; Expressão – <i>CCND1</i> (+); Alteração – <i>FGFR3</i>
E2F3/RB1	Ganho – <i>E2F3</i> , 5p; Perda – <i>RBI</i> , <i>PTEN</i> , 2q36, 16q, 20q; Expressão – <i>CDKN2A</i> (+)
Circuitos sugeridos	
RAF1/RAS	Ganho – <i>RAF1</i> ; Mutação – <i>RAS</i> ; Expressão – <i>FGFR3</i> (±)
TP53/MDM2	Ganho – <i>CCND1</i> ; Alteração – <i>TP53/MDM2</i>

Dos doentes estudados, apenas os Doentes 4 e 5 não apresentam qualquer alteração descrita na Tabela 13. É de salientar que, o Doente 5 apresenta um tumor do tipo T1,G1 ou seja, é um tumor não invasivo e como tal, de acordo com a literatura, a instabilidade cromossómica poderá ser baixa dificultando a sua detecção. Quanto ao Doente 4, este corresponde a um tumor T1,G3 ou seja, é um tumor muito próximo dos tumores invasivos. Com a realização do aCGH não se detectou qualquer alteração referida na Tabela 13, tal como discutido anteriormente por se suspeitar de que a biópsia colhida referente a este caso continha uma elevada contaminação com células não tumorais. A ser verdade, essa contaminação leva a uma incapacidade de detectar alterações existentes nas células tumorais. É de salientar que por MLPA e por MS-MLPA não se registaram quaisquer alterações do número de cópias para os Doentes 4 e 5, à excepção do gene *CASR* (exão 8) que apresentou ganho para o Doente 5 (anexo V).

Importa salientar também que em 64,3% (9/14) dos casos verificou-se a existência de perdas associadas ao gene *TP53* confirmando assim os resultados obtidos por MS-MLPA. Por outro lado é também de realçar que em 8 dos 9 casos que apresentam perda deste gene, esta está associada a uma perda de cerca de 10 Mb. O gene *TP53* localizado

no cromossoma 17p13.1 codifica a proteína p53 que possui uma actividade anti-proliferativa essencial na regulação do ciclo celular¹³⁸. De acordo com a literatura, alterações neste gene em tumores superficiais são relativamente raras (19% dos casos) enquanto que são muito frequentes em tumores invasivos (44% dos casos) e em Tis (52% dos casos)^{89,139}. Alterações deste gene apresentam-se assim associadas a prognósticos reservados. O tipo de alterações mais frequentemente associadas a este gene são a ocorrência de deleções, que induzem a perda total ou parcial do gene, ou a ocorrência de mutações^{89,138}. No caso específico das mutações, estima-se que cerca de 80% das mutações associadas a este gene são do tipo *missense* podendo levar à formação de proteínas truncadas⁸⁹. Neste gene podem ainda ser encontradas mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* contudo apresentam taxas de incidência consideravelmente menores¹³⁸. Nestes últimos casos, verifica-se a formação de codões de finalização prematuramente devido ou à formação directa de um codão desse tipo ou por alteração da ordem de leitura da sequência^{89,138}. Todavia, em qualquer dos processos, por deleção ou pelos diferentes tipos de mutações, verifica-se uma inactivação da via metabólica reguladora da proliferação celular¹²⁵. Assim, aquando da ocorrência de erros durante o ciclo celular, este não é bloqueado o que pode ser problemático na manutenção da arquitectura tecidual. Alterações neste gene são muito frequentes também em outros tipos de cancro como cancro da mama, sarcomas, tumores cerebrais entre outros¹³⁸. Porém, este gene continua a ser considerado como um importante marcador no que diz respeito à progressão de tumores da bexiga quer invasivos quer não invasivos^{13,125,139}.

Na literatura estão descritos vários genes e alterações genómicas que mostram alguma associação com a progressão, agressividade e a recorrência tumoral. Entre essas alterações salientam-se perdas associadas aos genes *TP53*, *PTEN*, *RB1* e *RBL1* e ganhos associados aos genes *CCND1*, *MDM2* e a perda do braço curto do cromossoma 5^{5,13,82,89}. Nas amostras estudadas por aCGH, verificou-se que os Doentes 3, 4 e 5 não apresentam qualquer alteração das regiões referidas anteriormente. Quanto aos restantes, todos eles apresentam pelo menos uma destas alterações, sendo que os Doentes 1 e 7 são os que apresentam maior número de alterações. O Doente 1 apresenta simultaneamente perda dos genes *TP53*, *PTEN*, *RB1* e *RBL1*. O Doente 7 apresenta perda do gene *TP53*, ganho dos genes *CCND1* e *MDM2* bem como ganho do cromossoma 5p. Assim, pela análise realizada sugere-se que os dois casos referidos anteriormente (Doentes 1 e 7) possuem um risco mais elevado de recorrência e

progressão tumoral. Neste âmbito, em termos futuros, será interessante realizar um acompanhamento clínico destes doentes.

Os genes *TSC1* e *TSC2* são genes que quando mutados nas linhas germinativas provocam a síndrome da esclerose tuberosa complexa. Todavia, nos últimos anos têm sido reportadas alterações no gene *TSC1* associadas a casos de CB¹⁴⁰, não se apresentando associado a outros tipos de tumores. Mais de 50% dos tumores da bexiga apresentam perda de heterozigotia do cromossoma 9 bem como do gene *TSC1* no locus 9p21^{138,141}. Por outro lado, este gene está também associado à ocorrência de mutações sendo sugerido actualmente que este se apresenta mutado em cerca de 14,5% dos casos de CB⁸⁹. Assim, este gene é um GST potencialmente relevante para o processo de carcinogénese em causa. Neste estudo, 35,7% (5/14) dos casos apresentam perda do gene *TSC1* contudo, existe um caso em que foi verificado ganho deste gene. Todavia, tal como discutido anteriormente, este ganho não implica necessariamente um aumento, nem sequer a simples expressão do referido gene. Relativamente ao gene *TSC2*, este apresentou perda em 42,8 % (6/14) dos casos estudados porém, a sua associação com o processo de carcinogénese da bexiga ainda não está perfeitamente clara.

De um modo geral, a análise realizada sugere que a classificação anatomo-patológica efectuada actualmente pode não reflectir por si só as características do tumor. Como se pode constatar, tumores do mesmo estadio e grau apresentam padrões de alterações diferentes. Neste âmbito, a análise genética poderá ser um importante auxílio na caracterização dos tumores e na realização de uma avaliação mais detalhada no que se refere à agressividade, progressão e recorrência tumoral. Como foi possível observar neste estudo, apesar do reduzido número de amostras, apenas 14,3% (2/14) dos casos não apresentaram qualquer alteração associada aos circuitos de carcinogénese estabelecidos até à data. Futuramente, com o aumento do número de doentes estudados, será possível estabelecer ainda com maior rigor as alterações relevantes neste processo.

5.2. Comparação dos resultados obtidos por aCGH e os resultados obtidos por MLPA e MS-MLPA

Na realização deste estudo recorreu-se à utilização de várias técnicas de biologia molecular e genómica (MLPA, MS-MLPA e aCGH). Estas técnicas apresentam características diferentes entre si mas apresentam um carácter complementar. No anexo V está representada uma tabela com a indicação de todos os resultados obtidos por

MLPA e MS-MLPA (número de cópias) bem como o resultado obtido por aCGH, para as posições nucleotídicas correspondentes às regiões estudadas pelas técnicas anteriores. Como é possível observar pela análise do anexo V, existe um elevado número de regiões que apresentam resultados não concordantes entre as diferentes técnicas que se podem dever a vários factores:

1) As técnicas de aCGH, MLPA e MS-MLPA apresentam limites de resolução diferentes^{87,100}. A técnica de aCGH permite realizar uma abordagem global do genoma com maior ou menor poder de resolução, de acordo não só com o número de sondas (plataforma utilizada) mas também de acordo com a distância existente entre elas⁸⁷. Por outro lado, as técnicas de MLPA e MS-MLPA (número de cópias) permitem uma avaliação de apenas cerca de 45 regiões do genoma em simultâneo. Apesar disto, a análise destas regiões é uma análise extremamente específica e sensível dado que, cada região é passível de ser analisada com mais detalhe^{100,102}. Na técnica de aCGH, de acordo com os critérios utilizados, só é considerada alteração quando se observa variação em mais de 3 sondas consecutivas. Este facto está na base da explicação de muitos dos resultados discordantes representados no anexo V. Na Figura 29 estão representados 3 casos em que se verificam divergências de resultados entre as técnicas utilizadas. Por exemplo, o Doente 12 não apresentou qualquer variação do número de cópias para o gene *PYCARD* (16p11.2) por MS-MLPA. Porém, por aCGH este gene apresenta-se associado a perda de material genético. Pela análise da Figura 29 (A), que representa a situação descrita, é possível compreender que não existe nenhuma sonda de aCGH que realmente se localize no gene referido. Assim, o resultado do número de cópias obtido por aCGH resulta da normalização realizada pelo *software* de análise e não de uma análise específica do gene. Deste modo, este gene pode não apresentar qualquer alteração, tal como detectado por MS-MLPA. Um outro exemplo justificativo das discrepâncias de resultados observadas está representado na Figura 29 (B). Neste caso (Doente 6), por MLPA foi detectada perda de material genético associada ao gene *WSB1*. Todavia, por aCGH nenhuma alteração foi detectada. Como podemos perceber pela Figura 29 (B) as duas sondas de aCGH localizadas na região do gene em causa apresentam sugestão de perda do gene. Porém dado o reduzido número de sondas consecutivamente alteradas, esta alteração não foi considerada. Neste caso temos, à partida, o surgimento de um falso negativo. Na Figura 29 (C) está representada mais uma situação de discrepância entre resultados. No caso do Doente 8 por MS-MLPA observou-se que uma das sondas para o gene *ATM* apresentava ganho e a outra

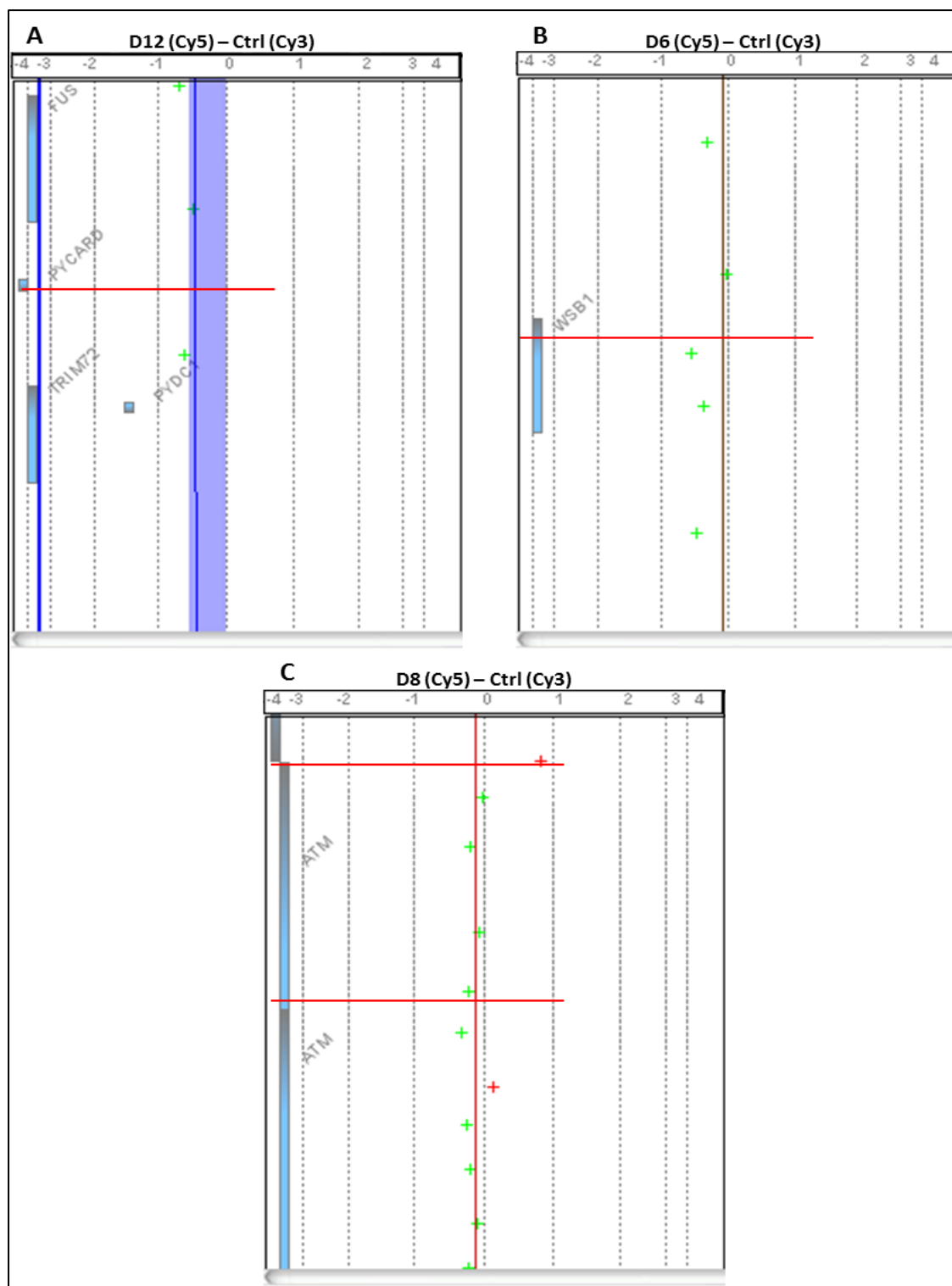


Figura 29: Representação de casos em que se verifica discordância entre os resultados obtidos por aCGH e MLPA/MS-MLPA (número de cópias). **A** - Dispersão das sondas de aCGH verificada para o Doente 12 na região do gene *PYCARD*; **B** - Dispersão das sondas de aCGH verificada para o Doente 6 na região do gene *WSB1*; **C** - Dispersão das sondas de aCGH verificada para o Doente 8 na região do gene *ATM*. Imagem retirada do *software Agilent Genomic Workbench v6.5*.

apresentava perda. Ao analisar os resultados de aCGH para este doente percebeu-se que aparentemente não existia qualquer alteração nesta região. Contudo, ao realizar uma

análise direccionada às sondas envolvendo o gene em causa verificou-se que existem grandes variações entre as sondas localizadas nas proximidades da região analisada por MS-MLPA. A sonda de aCGH localizada imediatamente antes da sonda de MS-MLPA para o gene *ATM* (exão 1) apresenta sugestão de ganho. Dada a proximidade entre a localização das sondas de aCGH e de MS-MLPA a existência de um ganho nesta região parece ser real, contudo devido ao reduzido número de sondas de aCGH alteradas, esta possível alteração não foi considerada pelo *software* de análise. Por outro lado, quanto às sondas de aCGH que se encontram nas proximidades do local de complementariedade da sonda de MS-MLPA estas sugerem a existência de perda em mosaico. Contudo, pelo mesmo motivo das alterações referidas anteriormente, esta não é também considerada. No caso específico deste gene, é igualmente de salientar a existência de ganho num exão e perda no outro.

2) O processo de carcinogénese está associado à existência de uma acentuada instabilidade cromossómica^{80,82}. A ocorrência de mutações é muito frequente⁸⁰. Quer para sondas de aCGH (de acordo com o tipo de lâmina utilizada) quer para sonda de MLPA e MS-MLPA, a existência de alterações desse tipo são suficientes para impedir uma hibridização completa entre a sonda e o DNA alvo^{100,102}. Deste modo podem ser originados falsos positivos¹⁰². Para a técnica de aCGH esta questão não é tão problemática dado que, nunca se considera como alterada uma região em que apenas uma das sondas apresentou variação. Por outro lado, no caso do MLPA e do MS-MLPA (número de cópias) com as sondas são analisadas individualmente, uma situação deste tipo pode mascarar um resultado real.

3) Um outro factor que poderá justificar a existência de ganhos e perdas simultaneamente no mesmo gene é a ocorrência de rearranjos equilibrados, como por exemplo translocações ou inversões. Estes tipos de alterações também ocorrem associadas ao desenvolvimento e progressão de tumores. Porém, nem por aCGH, nem por MLPA ou MS-MLPA é possível detectar rearranjos equilibrados^{87,100}. Deste modo, neste tipo de alterações, caso os pontos de quebra envolvam as regiões analisadas pelas técnicas referidas, a hibridização das sondas com o local complementar não ocorre e verifica-se a existência de um resultado inadequado.

Assim, a existência de um elevado número de regiões que apresentam resultados discrepantes entre as técnicas não sugere um desadequamento da estratégia adoptada ou uma inexistência de coesão entre os resultados obtidos. A existência deste tipo de resultados implica a realização de uma análise cuidada que é necessária efectuar para a

comparação de resultados obtidos por aCGH, MLPA e MS-MLPA. Neste estudo, foram analisadas, individualmente, todas as regiões que apresentavam discrepância entre os resultados. Com essa análise, conclui-se que a grande maioria dos resultados discrepantes eram passíveis de serem justificados de acordo com os factores referidos anteriormente e representados na Figura 29.

6. Optimização do protocolo de estabelecimento de culturas celulares primárias e sub-culturas

6.1. Estabelecimento de culturas celulares primárias

Das 18 amostras incluídas no estudo, foram iniciadas culturas celulares em 16 dos casos. De um modo geral, foi observado crescimento de células epiteliais em 50% (8/16) dos casos, sendo que em apenas 6,3% (1/16) não foi observado qualquer crescimento (Doente Controlo 1). De igual modo, em 6,3% (1/16) dos casos verificou-se crescimento de apenas fibroblastos (Doente 4). Em 37,4% (6/16) dos casos, a cultura apresentou contaminação no dia seguinte à realização da sementeira.

O estabelecimento de culturas celulares primárias tem uma extrema importância em estudos relacionados não só com o CB mas com os processos de carcinogénese em geral¹⁴². O estabelecimento de culturas celulares permite a utilização futura de células na realização de estudos farmacológicos, citogenéticos, imunológicos, entre outros^{142,143}.

No caso específico do CB não existe consenso entre as metodologias a utilizar no estabelecimento de culturas primárias, sendo que mesmo em procedimentos optimizados, as taxas de sucesso são reduzidas. Neste estudo foi utilizado o procedimento descrito por Fu e colaboradores¹¹¹ em 2005 como procedimento basal, sujeito a algumas adaptações de forma a dar resposta aos problemas que foram surgindo:

1) Infecção das culturas.

Inicialmente, após o acto cirúrgico, as amostras destinadas à realização da cultura celular foram transportadas em HBSS suplementado com 0,1% P+S (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Porém, verificou-se que as culturas apareciam sistematicamente contaminadas. Por observação ao microscópio invertido, percebeu-se que a fonte de contaminação estaria possivelmente associada a infecções urinárias nos doentes. Poucas horas após a sementeira, constatava-se a presença de alos circulares

fixos à base da caixa em torno dos fragmentos de tecido. No dia seguinte, a contaminação já se apresentava dispersa por toda a caixa. Na literatura está reportada a existência de contaminações causadas por fungos e bactérias em amostras deste tipo de tal forma que, a contaminação por bactérias, é considerada a principal causa de falência das culturas¹⁴⁴. Defende-se que a grande maioria das contaminações ocorridas durante as primeiras 24 a 48 horas após a sementeira está associada à origem do tecido^{111,145}. Na tentativa de ultrapassar esta questão, decidiu-se aumentar a concentração de antibióticos quer no meio de transporte quer no meio de cultura utilizado aquando da sementeira. Assim, o transporte das amostras passou a ser realizado igualmente em HBSS mas suplementado com 1% P+S. Quanto ao meio de cultura para a realização da sementeira, passou a conter 2% de P+S. Após esta alteração o número de contaminações diminuiu para 25% (2/8).

2) Crescimento de fibroblastos.

Neste tipo de culturas, a crescimento de fibroblastos é também comum^{111,146}. Os fibroblastos são células que apresentam uma taxa de crescimento muito acentuada (ao contrário de algumas células tumorais) o que leva a que muitas vezes as células epiteliais acabem por ser eliminadas. Porém, neste estudo apenas uma cultura (correspondente ao Doente 4) é que apresentou crescimento de fibroblastos. Isto poderá dever-se ao facto de que nas culturas realizadas foi utilizada uma matriz de colagénio tipo I que, associado a baixas concentrações de FBS (1%), dificultam o crescimento e proliferação desse tipo de células^{111,147}.

3) Taxa de crescimento reduzida.

Segundo a literatura disponível, as taxas de crescimento de culturas primárias de CB são relativamente baixas. Porém, em 2007, Seifert e colaboradoras¹⁴³ descreveram uma nova metodologia de estabelecimento de culturas celulares primárias em que as taxas de sucesso aumentaram para os 63%, verificando-se que a taxa de sucesso das culturas se mostrava dependente do estadio e grau tumoral. Tumores do tipo pTa apresentavam uma taxa de sucesso de 86,4% enquanto tumores do tipo pT1 e de estadios avançados apresentavam taxas de sucesso de 50% e 38% respectivamente¹⁴³.

Relativamente às amostras que apresentaram crescimento de células epiteliais (50%), importa referir que, apenas 3 das 8 culturas (37,5%) (Doentes 3 e 11 e Doente Controlo 4) apresentaram um crescimento adequado permitindo a sua manipulação e a realização de estudos com essas células. As restantes culturas ou apresentavam uma taxa de crescimento muito reduzida ou, nos casos em que a taxa de crescimento era

acentuada, as células acabariam por se libertar naturalmente da superfície revestida com colagénio, num período de 5 a 7 dias. Na tentativa de ultrapassar esta questão, decidiu-se começar a adicionar glicina ao meio de cultura. De acordo com o descrito por Seifert e colaboradores¹⁴³, em 2007, a adição de glicina (3mM) ao meio de cultura aumenta a viabilidade celular em 3,6 vezes¹⁴³. A glicina estimula a adesão celular por acção das integrinas¹⁴⁸. O presente estudo, só foi possível testar a acção da glicina em uma das 16 culturas. Na cultura referida, adicionou-se glicina logo no meio aquando da sementeira (cultura correspondente ao Doente Controlo 4) e verificou-se um crescimento celular acentuado sem nunca se observar indícios de desagregação das células do substrato. Contudo, como já foi referido, a glicina apenas foi testada numa cultura, não podendo assim afirmar-se que o sucesso da mesma está directamente relacionado com a utilização da glicina. A Figura 30 é um exemplo do aspecto das culturas utilizadas neste estudo e que apresentaram um crescimento acentuado.

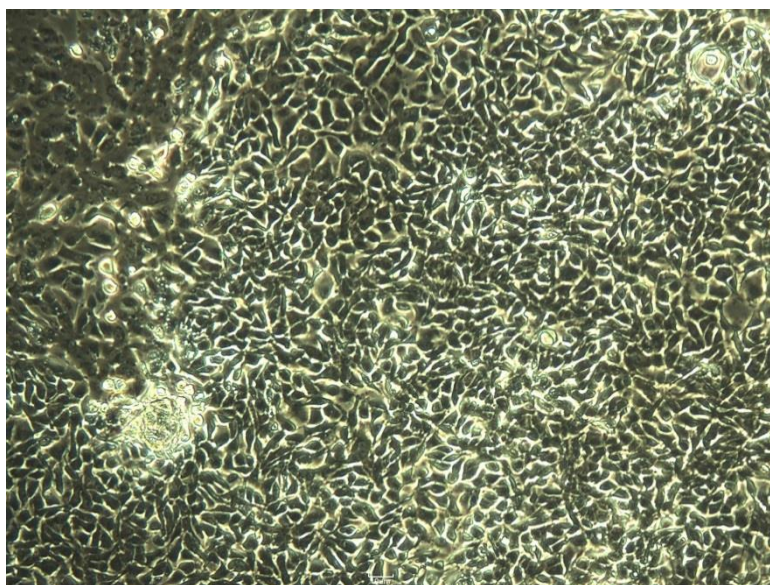


Figura 30: Figura representativa do aspecto das culturas primárias realizadas e que apresentaram um bom crescimento. Cultura referente ao Doente 3.

6.2. Estabelecimento de sub-culturas

Nas culturas celulares referentes aos Doentes 3 e 11 tentou-se também o estabelecimento de sub-culturas e a sua manipulação para estudos citogenéticos. Quanto ao estabelecimento de sub-culturas, numa fase inicial, com a cultura referente ao Doente 3 procedeu-se à dissociação celular recorrendo à acção da tripsina. Contudo, embora este procedimento tenha sido realizado várias vezes, em nenhum caso se obteve

crescimento celular na sub-cultura. Na sub-cultura nunca se observou adesão celular à membrana de colagénio que revestia a caixa de cultura. Para além disso, as células na nova caixa rapidamente perdiam o aspecto brilhante característico de células vivas. No que diz respeito à cultura inicial, após cada ciclo de tripsinização, verificava-se uma perda considerável da viabilidade celular de tal forma que, a cultura chegou a demorar vários meses até se notar um aumento da confluência. Com a repetição dos ciclos de tripsinização e da não obtenção de qualquer sucesso neste processo de estabelecimento de subculturas, colocou-se a hipótese de testar um outro agente dissociador celular que apresentasse uma menor toxicidade celular. Optou-se por testar a *StemPro*® *Accutase*® (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). A *Accutase*® foi aplicada várias vezes à cultura correspondente ao Doente 11 sendo que, em apenas numa das vezes foi possível estabelecer uma sub-cultura. Nas primeiras aplicações da *Accutase*® verificou-se que a cultura original não era comprometida conseguindo restabelecer o índice mitótico muito mais rapidamente do que no caso em que se utilizou a tripsina. Porém, apesar de não haver comprometimento da cultura inicial, continuava a não haver adesão celular nas culturas filhas. Deste modo decidiu-se testar uma nova estratégia de estabelecimento de sub-culturas. Esta nova estratégia consistiu na realização de uma centrifugação da suspensão celular (200g – 4 min), após a acção da *Accutase*®, seguida de distribuição homogénea do *pellet* pela superfície revestida da caixa. De seguida a caixa foi incubada invertida até ao dia seguinte. Com esta metodologia observou-se não só adesão celular, bem como crescimento celular. Apesar disso, esta sub-cultura nunca atingiu a confluência necessária. Este procedimento foi executado em apenas um caso dado à falta de células disponíveis para realização do procedimento. Assim, seria necessário a repetição deste procedimento para que se pudesse afirmar com algum grau de certeza que o sucesso da cultura esteve associado directamente à nova metodologia adoptada.

Segundo a literatura, quer a tripsina quer a *Accutase*® são dois dissociadores celulares utilizados com frequência em estudos relacionados com o CB^{143,149,150}. Porém, a *Accutase*® apresenta uma menor toxicidade celular não afectando significativamente a viabilidade e proliferação celular^{149,151}. Por outro lado, sugere-se que a tripsina está associada a uma diminuição de cerca de 3% da capacidade de adesão celular¹⁵¹.

7. Estudo por FISH de culturas primárias de cancro da bexiga

A manipulação das culturas celulares foi realizada com objectivo inicial da obtenção de cromossomas para o estudo do cariótipo. Apenas as culturas referentes aos Doentes 3 e 11 mostraram ter material biológico suficiente para serem manipuladas. Nas restantes culturas, por apresentarem um baixo crescimento ou por se apresentarem contaminadas, não foi possível obter células em quantidade suficiente. Quanto à cultura do Doente Controlo 4, apresentou um crescimento acentuado mas não atingiu a confluência necessária até ao término do presente trabalho.

A cultura de células referente ao Doente 3 foi manipulada três vezes, porém em nenhum dos casos foi possível obter cromossomas em metafase que possibilitassem o estudo do cariótipo. Quanto ao Doente 11, a cultura celular foi manipulada uma vez e, de igual modo, não se obteve qualquer metafase.

Dada a incapacidade de realização de um estudo do cariótipo, optou-se pela aplicação da técnica de FISH. Com o teste UroVysion® que consiste numa combinação de sondas de FISH específicas que permitem detectar poliploidias para os cromossomas 3, 7 e 17 e deleções do *locus* 9p21¹⁵². Estes cromossomas, bem como o *locus* 9p21, estão fortemente associados ao processo de carcinogénese da bexiga¹⁵². Assim, mesmo não sendo direccionado para células em cultura decidiu-se aplicar este teste no estudo da cultura do Doente 11 devido à combinação de sondas que permite.

A análise dos resultados foi realizada pela observação ao microscópio de fluorescência de 254 núcleos interfásicos. Desta análise foram observados 236 (92,9%) núcleos interfásicos normais (com dois sinais de fluorescência para cada sonda – Figura 31 A)) e 18 (7,1%) núcleos com alterações (Figura 31 B). Entre estes é de registar a existência de 13 (5,1%) núcleos com aparente monossomia do cromossoma 17 (Figura 31 (B)).

O resultado do teste UroVysion® para o Doente 11 é negativo, como podemos compreender pela análise da Tabela 14. Com base nos critérios definidos pelo fabricante, a forma de determinar um resultado como positivo consiste em: - observar 4 ou mais células, em 25, com ganho em dois ou mais dos cromossomas 3, 7 ou 17; - observar 12 ou mais células, em 25, com deleção homozigótica do *locus* 9p21. Segundo as instruções do fabricante, quando se observa o número de células referido e não se encontra o número de alterações suficientes para que o resultado seja positivo, deve-se continuar a análise até encontrar pelo menos 4 células com ganho em pelo

menos 2 dos cromossomas 3, 7 e 17 ou pelo menos 12 células com deleção homozigótica do *locus* 9p21. Nos casos em que se observam todas as células marcadas e nenhum destes critérios é respeitado, então o resultado é efectivamente negativo.

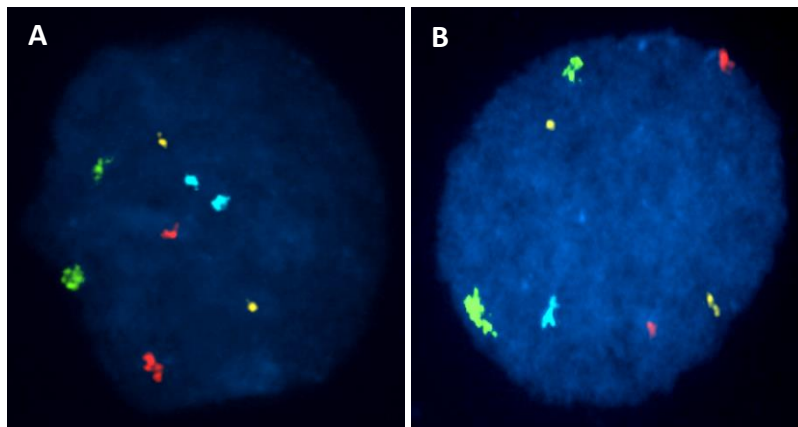


Figura 31: Células observadas ao microscópio de fluorescência pela realização do teste UroVysion® em células provenientes de cultura primária referente ao Doente 11. **A** – Célula normal (duas marcações para cada marcação); **B** – Célula com perda de uma das marcações correspondentes ao cromossoma 17.

Legenda - Marcações: **Cromossoma 3** – vermelho (CEP 3); **Cromossoma 7** – verde (CEP 7); **Cromossoma 17** – azul (CEP17); **Locus 9p21** – amarelo (LSI 9p21).

Tabela 14: Resultados obtidos pela realização da técnica de FISH em células resultantes da cultura primária referente ao Doente 11.


LSI 9p21	CEP 3	CEP 7	CEP17	N.º Células	%
2	2	2	2	236	92,9
1	2	2	2	2	0,8
2	2	2	1	13	5,1
2	2	2	3	1	0,4
3	2	2	2	1	0,4
2	3	2	2	1	0,4
Total				254	100

O cancro está directamente relacionado com o fenómeno de instabilidade cromossómica. Alterações numéricas, como poliploidias e aneuploidias, são muito frequentemente observadas em células tumorais, porém alterações estruturais, como as translocações, desempenham um papel igualmente importante^{136,153}.

As sondas fluorescentes utilizadas para a marcação dos cromossomas 3, 7 e 17 são sondas específicas para as regiões centroméricas^{71,152}. Todavia, como todas as sondas de FISH, estas apesar de poderem ser indicativas do número de cromossomas existentes, apenas definem com certeza o número de regiões com que são complementares¹⁵⁴. Nos

resultados obtidos, verifica-se a perda de um sinal de fluorescência referente ao cromossoma 17 em 13 células. Este resultado poderia sugerir a existência de uma perda total do cromossoma 17 nessas células. Pela técnica de aCGH verificou-se que o Doente 11 apresenta maioritariamente perda parcial do cromossoma mas não perda total. Por outro lado, as técnicas de MLPA e MS-MLPA também sugerem a inexistência de uma perda total associada aos cromossomas 17. Por estas duas técnicas foram estudadas 9 regiões genéticas sendo que apenas 2 apresentaram resultados sugestivos de perda. Como tal, pode-se concluir que por intermédio de uma sonda de FISH não se pode inferir sobre uma possível alteração do cromossoma na sua totalidade. A diferença de resultados entre o MLPA e MS-MLPA e o aCGH pode ser explicada com base na diferença de resolução das duas técnicas, tal como discutido anteriormente. Contudo, no caso específico do resultado observado para o Doente 11, a observação de ganho do cromossoma 17 seria o mais esperado.

Um tumor corresponde a uma massa celular que possui células com diferentes complementos cromossómicos¹³⁶. Apesar de pela realização de uma biópsia tumoral, apenas se obter uma porção de todo o tumor aquando da realização de uma cultura celular primária podemos vir a obter crescimento de vários tipos de células (células não tumorais ou células tumorais com diferentes complementos cromossómicos). Muitas vezes a cultura de células acaba por representar apenas um tipo de células, dadas as diferentes taxas de crescimento das células e a adaptação ao meio de cultura entre outros factores. No caso do Doente 11, apesar do crescimento verificado ser acentuado, podemos estar na presença apenas de crescimento de células não tumorais. No caso de existirem células tumorais, estas podem estar presentes em tão reduzido número que não sejam assim detectadas por FISH. Por outro lado, o tumor referente ao Doente 11 é um tumor do tipo Ta,G1. Este tumor, de acordo com o sistema TNM é um tumor inicial, no que diz respeito ao estadio de desenvolvimento. De acordo com a literatura, a instabilidade cromossómica é directamente proporcional ao estadio e grau de desenvolvimento tumoral⁸². Neste caso, como estamos perante um tumor inicial poder-se-ia concluir que a ausência de alterações observadas poderia ser explicada por este facto. Todavia, as alterações consideradas neste teste, essencialmente as deleções do *locus* 9p21, estão descritas com uma das alterações primordiais no processo de carcinogénese da bexiga¹⁵⁴. Sendo este um tumor inicial, a probabilidade de serem observadas alterações nesta região seria elevada, porém nem por MLPA foram detectadas perdas nesta região cromossómica.



Capítulo V
Conclusões e
Perspectivas
Futuras

Capítulo V – Conclusões e Perspectivas Futuras

1. Conclusões do estudo

Através dos resultados obtidos e de acordo com os objectivos propostos e as limitações referidas concluiu-se com a realização deste estudo que:

1. As técnicas de MLPA, MS-MLPA e aCGH permitiram identificar regiões genómicas e genes frequentemente alterados nas amostras de CB estudadas. Verificou-se que:

1.1. A técnica de MLPA apresenta robustez na detecção de alterações genómicas em amostras de CB. O maior número alterações (ganhos e perdas) foi observado para os cromossomas 3, 7, 9 e 17. Para além disso, verificou-se a existência de uma elevada frequência de alterações (> 30% dos casos) para genes como *PPOX*, *FHIT* (exão 9), *EPHA3*, *CLIP2*, *CDKN2A* (exões 5, 3 e 1), *CDKN2A* (intrão 1), *CDKN2B* (exão 1), *WSB1* e *HSPA13*;

1.2. Por MLPA observaram-se elevadas frequências de alterações em genes que não estão descritos em casos de CB. Os genes *PPOX*, *SLC7A9* e *HSPA13* apresentaram-se frequentemente alterados nos casos estudados. Porém, na literatura a sua associação ao fenómeno de carcinogénese da bexiga não está descrita;

1.3. A técnica de MLPA mostrou-se igualmente robusta na detecção de mutações frequentes em casos de CB. Por esta técnica foram detectadas mutações nos genes *PIK3CA* e *FGFR3* em alguns casos, de acordo com o descrito na literatura;

1.4. A técnica de MS-MLPA revelou uma elevada capacidade para detecção de regiões frequentemente alteradas no CB ao nível do número de cópias. Neste estudo foi possível identificar alterações muito frequentes entre os doentes estudados e com impacto descrito no processo de carcinogénese da bexiga. Entre os genes alterados, salienta-se o gene *TP53* que apresentou alterações em 64,2% dos casos;

1.5. Por aCGH foram identificados padrões de alterações com elevadas taxas de frequência entre as amostras estudadas, porém nem todas estão de acordo com o descrito na literatura. Importa salientar os ganhos no braço longo do cromossoma 13 que apenas foram observados em tumores do tipo T1G2. Foram também registadas elevadas taxas de perda associadas aos cromossomas 16, 19 e 22q. Estas alterações não estão descritas na literatura como muito frequentes em casos de CB. A identificação de novas regiões cromossómicas possivelmente associadas ao CB foi um importante

contributo dado pela técnica de aCGH.

2. Por MS-MLPA foi possível identificar alterações no padrão de metilação de genes com associação directa ao CB. Foram também detectadas elevadas percentagens de metilação para genes em que a relação com o CB não está definida.

3. Pela optimização do procedimento de extracção de DNA de células da bexiga excretadas na urina sujeitas a um pré-tratamento foi possível obter amostras deste ácido nucleico com uma qualidade óptima para a realização de técnicas de biologia molecular, como o MLPA;

3.1. A avaliação de amostras de DNA extraído de urina, por MLPA, revelou-se promissora. Isto porque, foi possível identificar alterações genéticas em DNA extraído de células de urina que igualmente foram observadas na amostra referente à biópsia tumoral. A associação entre alterações detectadas directamente na biópsia tumoral e na urina foi de tal modo eficiente que, para os genes *CDKN2B*, *AURKA* (exão 5), *MDM2* (exão 11), *NOS2*, *CCND1* (exão 1), *ROBO1* e *ARL13B* foi alcançada significância estatística.

4. O estabelecimento de culturas primárias de CB mostrou-se extremamente difícil. Contudo, durante este estudo foi possível optimizar alguns dos principais procedimentos a adoptar neste contexto.

5. A técnica de FISH é importante na detecção de alterações cromossómicas em núcleos em interfase. Contudo, esta técnica foi aplicada a título exploratório apenas numa amostra, não sendo possível inferir com certeza sobre a vantagem de utilizar o teste UroVysion® na avaliação de células em cultura.

6. Não foi possível estabelecer uma relação directa entre as alterações detectadas e o estadio e o grau tumoral. Porém, com os resultados obtidos sugere-se que a análise genómica poderá ser um importante auxílio na caracterização tumoral, no diagnóstico e seguimento de doentes com CB.

2. Limitações do estudo

Para além das conclusões referidas, há ainda a referir as limitações mais evidentes deste estudo. Assim, as principais limitações deste estudo são:


- O reduzido número de amostras tumorais analisadas. Entre os 14 doentes estudados existem tumores de vários estadios e graus. Porém, dentro do mesmo estadio e grau, o número de casos estudados é reduzido. Um aumento do número de doentes estudados (quer ao nível de biópsias tumorais quer de urinas) irá permitir validar os resultados obtidos.
- O desconhecimento sobre a região anatómica da bexiga em que se encontravam os tumores estudados bem como sobre a informação relativa aos hábitos tabágicos dos doentes e da sua profissão.
- A incapacidade da realização de estudos do cariótipo a partir das biópsias. O estudo do cariótipo seria importante não só para avaliar os complementos cromossómicos existentes neste tipo de amostras bem como para conservação das culturas para estudos futuros.

3. Perspectivas futuras

Em termos futuros existem várias abordagens a realizar de modo a aumentar a significância do estudo e a preencher algumas das lacunas existentes, nomeadamente:

- Aumentar o número de amostras (biópsias tumorais + urina correspondente) de forma a validar algumas das hipóteses colocadas neste estudo. O aumento do número de amostras de urina estudadas permitirá validar não só o processo de pré-tratamento otimizado bem como a capacidade de detecção desta neoplasia por intermédio deste biofluido, obtido de forma não invasiva.
- Estudar as amostras extraídas de urina pela técnica de MS-MLPA. A avaliação do número de cópias em simultâneo com o estudo do estado de metilação dos respectivos genes é uma abordagem promissora.
- Continuar a optimização do processo de cultura celular de modo a possibilitar o estudo do cariótipo. Para além disso, a optimização do procedimento de cultura celular será importante para compreender em que medida é possível reproduzir as células tumorais, *in vitro*, de forma a possibilitar estudos posteriores.

- Desenvolver um painel de sondas de MS-MLPA e otimizar o painel de sondas de MLPA utilizado (específico para amostras de CB), para auxiliar na caracterização tumoral, mas também no diagnóstico, seguimento, adaptação de estratégias terapêuticas e na avaliação do prognóstico de cada doente.



Capítulo VI
Referências
Bibliográficas

Capítulo VI – Referências Bibliográficas

1. Tyler A. Urothelial cancers: ureter, renal pelvis, and bladder. *Seminars in Oncology Nursing*. 2012;28(3):154–162.
2. Rouprêt M, Zigeuner R, Palou J, Boehle A, Kaasinen E, Sylvester R, Babjuk M, Oosterlinck W. European guidelines for the diagnosis and management of upper urinary tract urothelial cell carcinomas: 2011 update. *European Urology*. 2011;59(4):584–594.
3. Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J, Rouprêt M. EAU Guidelines on Non–Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *European Urology*. 2011;59(6):997–1008.
4. Di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA. A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. *Advances in Urology*. 2012;2012:1–10.
5. Cancer TIA for R on. *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 1st ed. (Eble J, Epstein J, Sesterhenn I, Sauter G, eds.). International Agency for Research on Cancer; 2004.
6. The Official Foundation of the American Association. The Management of Nonmuscle invasive Bladder Cancer - Patient Guide. 2012. Proveniente de: http://www.urologyhealth.org/_media/_pdf/AUAFBladderCancerPGuide2012.pdf. Visitado a: 22/04/2013.
7. Alexander RE, Hu Y, Kum JB, Montironi R, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Idrees MT, Emerson RE, Ulbright TM, Grignon DG, Eble JN, Cheng L. p16 expression is not associated with human papillomavirus in urinary bladder squamous cell carcinoma. *Modern Pathology*. 2012;25(11):1526–1533.
8. Tavora F, Epstein JI. Bladder cancer, pathological classification and staging. *BJU International*. 2008;102(9b):1216–1220.
9. Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. 2006;27(3):361–373.
10. Chade DC, Shariat SF, Godoy G, Meryn S, Dalbagni G. Critical review of biomarkers for the early detection and surveillance of bladder cancer. *Journal of Men's Health*. 2009;6(4):368–382.
11. Sievert K, Amend B, Nagele U, Schilling D, Bedke J, Horstmann M, Hennenlotter J, Kruck S, Stenzl A. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs? *World Journal of Urology*. 2009;27(3):295–300.

12. Kim WJ, Bae SC. Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Science*. 2008;99(4):646–652.
13. Netto GJ. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? *Nature Reviews Urology*. 2011;9(1):41–51.
14. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003;21(18):1315–1330.
15. U.S. National Institutes of Health. Graph by Cancer Site & Phase of Care | Cancer Prevalence and Cost of Care Projections. Proveniente de: <http://costprojections.cancer.gov/graph.php>. Visitado a: 7/02/2013.
16. Larré S, Catto JWF, Cookson MS, Messing EM, Shariat SF, Soloway MS, Svatek RS, Lotan Y, Zlotta AR, Grossman HB. Screening for Bladder Cancer: Rationale, Limitations, Whom to Target, and Perspectives. *European Urology*. 2013.
17. Van Tilborg AAG, Bangma CH, Zwarthoff EC. Bladder cancer biomarkers and their role in surveillance and screening. *International Journal of Urology*. 2009;16(1):23–30.
18. Zuiverloon TCM, Beukers W, van der Keur KA, Munoz JR, Bangma CH, Lingsma HF, Eijkemans MJC, Schouten JP, Zwarthoff EC. A methylation assay for the detection of non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) recurrences in voided urine. *BJU International*. 2012;109(6):941–948.
19. Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, Feng A-C, Boyd S, Skinner E, Bochner B, Thangathurai D, Mikhail M, Raghavan D, Skinner DG. Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1,054 Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2001;19(3):666–675.
20. Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 2005;66(6 Suppl 1):4–34.
21. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69–90.
22. WHO, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. Proveniente de: <http://globocan.iarc.fr/>. Visitado a: 31/03/2013.
23. DeLancey JOL, Thun MJ, Jemal A, Ward EM. Recent Trends in Black-White Disparities in Cancer Mortality. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008;17(11):2908–2912.

24. Lee CT, Dunn RL, Williams C, Underwood W 3rd. Racial disparity in bladder cancer: trends in tumor presentation at diagnosis. *Journal of Urology*. 2006;176(3):927–934.
25. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annual Review of Pathology*. 2009;4:251–285.
26. Kiriluk KJ, Prasad SM, Patel AR, Steinberg GD, Smith ND. Bladder cancer risk from occupational and environmental exposures. *Urologic Oncology*. 2012;30(2):199–211.
27. Castela JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC. Gender- and smoking-related bladder cancer risk. *Journal of National Cancer Institute*. 2001;93(7):538–545.
28. Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicology Letters*. 2010;193(2):131–137.
29. Letasiova S, Medvedova A, Sovcikova A, Dusinska M, Volkovova K, Mosoiu C, Bartonova A. Bladder cancer, a review of the environmental risk factors. *Environmental Health*. 2012;11(Suppl 1):S11.
30. Botelho MC, Vale N, Gouveia MJ, Rinaldi G, Santos J, Santos LL, Gomes P, Brindley PJ, Correia da Costa JM. Tumour-like phenotypes in urothelial cells after exposure to antigens from eggs of *Schistosoma haematobium*: An oestrogen–DNA adducts mediated pathway? *International Journal for Parasitology*. 2013;43(1):17–26.
31. Mostafa MH, Sheweita SA, O’Connor PJ. Relationship between Schistosomiasis and Bladder Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(1):97–111.
32. Zhong X, Isharwal S, Naples JM, Shiff C, Veltri RW, Shao C, Bosompem KM, Sidransky D, Hoque MO. Hypermethylation of Genes Detected in Urine from Ghanaian Adults with Bladder Pathology Associated with *Schistosoma haematobium* Infection. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59089.
33. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Böhle A, Palou J, Buckley R, Lamm D, Brausi M, Witjes JA, Persad R. Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements*. 2008;7(10):618–626.
34. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer*. 2006;118(12):3030–3044.
35. Barghi MR, Rahjoo T, Borghei M, Hosseini-Moghaddam SM, Amani D, Farrokhi B. Association between the evidence of human papilloma virus infection in bladder

- transitional cell carcinoma in men and cervical dysplasia in their spouses. *Archives of Iranian Medicine*. 2012;15(9):572–574.
36. Kakehi Y, Hirao Y, Kim WJ, Ozono S, Masumori N, Miyanaga N, Nasu Y, Yokomizo A. Bladder Cancer Working Group report. *Japanesen Journal of Clinical Oncology*. 2010;40 Suppl 1:i57–64.
 37. Hartge P, Harvey EB, Linehan WM, Silverman DT, Sullivan JW, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(20):1636–1640.
 38. Huang AT, Kogevinas M, Silverman DT, Malats N, Rothman N, Tardón A, Serra C, García-Closas R, Carrato A, Cantor KP. Bladder cancer and reproductive factors among women in Spain. *Cancer Causes Control*. 2009;20(10):1907–1913.
 39. Rodríguez LV, Wang B, Shortliffe LMD. Structural changes in the bladder walls of pregnant and hormone-treated rats: correlation with bladder dynamics. *BJU International*. 2004;94(9):1366–1372.
 40. McGrath M, Michaud DS, De Vivo I. Hormonal and reproductive factors and the risk of bladder cancer in women. *American Journal of Epidemiology*. 2006;163(3):236–244.
 41. Dietrich K, Demidenko E, Schned A, Zens MS, Heaney J, Karagas MR. Parity, early menopause and the incidence of bladder cancer in women: A case–control study and meta-analysis. *European Journal of Cancer*. 2011;47(4):592–599.
 42. Shariat SF, Milowsky M, Droller MJ. Bladder cancer in the elderly. *Urologic Oncology*. 2009;27(6):653–667.
 43. Sawhney R, Sehl M, Naeim A. Physiologic aspects of aging: impact on cancer management and decision making, part I. *Cancer Journal*. 2005;11(6):449–460.
 44. Schmucker DL. Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Experimental Gerontology*. 2005;40(8–9):650–659.
 45. Sehl M, Sawhney R, Naeim A. Physiologic aspects of aging: impact on cancer management and decision making, part II. *Cancer Journal*. 2005;11(6):461–473.
 46. Mühlberg W, Platt D. Age-dependent changes of the kidneys: pharmacological implications. *Gerontology*. 1999;45(5):243–253.
 47. Negri E, Vecchia CL. Epidemiology and prevention of bladder cancer. In: MD PB, MD FP, eds. *Invasive Bladder Cancer*. Springer London; 2007:1–14. Proveniente de: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-84628-377-2_1. Visitado a: 19/03/2013.
 48. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–867.

49. Li N, Yang L, Zhang Y, Zhao P, Zheng T, Dai M. Human papillomavirus infection and bladder cancer risk: a meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(2):217–223.
50. Shigehara K, Sasagawa T, Kawaguchi S, Nakashima T, Shimamura M, Maeda Y, Konaka H, Mizokami A, Koh E, Namiki M. Etiologic role of human papillomavirus infection in bladder carcinoma. *Cancer*. 2011;117(10):2067–2076.
51. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of Surgical Oncology*. 2010;17(6):1471–1474.
52. Greene FL, Canc AJC on, Society AC. *Ajcc Cancer Staging Manual*. Springer-Verlag; 2002.
53. Calais da Silva F - Grupo Português Génito-Urinário. *Recomendações Terapêuticas para os Tumores Malignos do Tracto Geniturinário*. 2nd ed. Albuquerque Designers, Lda.; 2007.
54. MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L. Histologic Grading of Noninvasive Papillary Urothelial Neoplasms. *European Urology*. 2007;51(4):889–898.
55. Montironi R, Lopez-Beltran A, Mazzucchelli R, Bostwick DG. Classification and grading of the non-invasive urothelial neoplasms: recent advances and controversies. *Journal of Clinical Pathology*. 2003;56(2):91–95.
56. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS Jr, Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, Carroll PR. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up. *Urology*. 2001;57(4):604–610.
57. Grossman HB, Messing E, Soloway M, Tomera K, Katz G, Berger Y, Shen Y. Detection of bladder cancer using a point-of-care proteomic assay. *The Journal of the American Medical Association*. 2005;293(7):810–816.
58. Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, Hisgen WJ, Barry Greenberg E, Kuglitsch ME, Wegenke JD. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. *Urology*. 1995;45(3):387–397.
59. Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, Malmström P-U, Stöckle M, Sternberg C. Guidelines on Bladder Cancer. *European Urology*. 2002;41(2):105–112.

60. Purysko AS, Leão Filho HM, Herts BR. Radiologic imaging of patients with bladder cancer. *Seminars in Oncology*. 2012;39(5):543–558.
61. Veeramachaneni R, Nordberg ML, Shi R, Herrera GA, Turbat-Herrera EA. Evaluation of fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool to urine cytology in diagnosing urothelial carcinoma. *Diagnostic Cytopathology*. 2003;28(6):301–307.
62. Nakazawa K, Murata S-I, Yuminamochi T, Ishii Y, Ohno S, Nakazawa T, Kondo T, Katoh R. p16INK4a Expression Analysis as an Ancillary Tool for Cytologic Diagnosis of Urothelial Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2009;132(5):776–784.
63. Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer MD, Love WR, Barkin J, Abara EO, Jansz K, Bridge JA, Johansson SL, Persons DL, Gibson JS. Use of a Multitarget Fluorescence In Situ Hybridization Assay to Diagnose Bladder Cancer in Patients With Hematuria. *Journal of Urology*. 2006;176(1):44–47.
64. Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf Jr JS, Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, Carroll PR. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy—part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up. *Urology*. 2001;57(4):604–610.
65. Bedke J, Buse S, Esposito I, Schirmacher P, Haferkamp A, Hohenfellner M. Evaluation and management of a patient with a bladder mass of uncertain etiology. *Nature Clinical Practice Urology*. 2008;5(9):509–514.
66. Verma S, Rajesh A, Prasad SR, Gaitonde K, Lall CG, Mouraviev V, Aeron G, Bracken RB, Sandrasegaran K. Urinary Bladder Cancer: Role of MR Imaging. *Radiographics*. 2012;32(2):371–387.
67. Zuiverloon TCM, Tjin SS, Busstra M, Bangma CH, Boevé ER, Zwarthoff EC. Optimization of nonmuscle invasive bladder cancer recurrence detection using a urine based FGFR3 mutation assay. *Journal of Urology*. 2011;186(2):707–712.
68. Bubendorf L. Multiprobe fluorescence in situ hybridization (UroVysion) for the detection of urothelial carcinoma - FISHing for the right catch. *Acta Cytologica*. 2011;55(2):113–119.
69. Tapia C, Glatz K, Obermann EC, Grilli B, Barascud A, Herzog M, Schönegg R, Savic S, Bubendorf L. Evaluation of chromosomal aberrations in patients with benign conditions and reactive changes in urinary cytology. *Cancer Cytopathology*. 2011;119(6):404–410.
70. Daniely M, Rona R, Kaplan T, Olsfanger S, Elboim L, Zilberstien Y, Friberger A, Kidron D, Kaplan E, Lew S, Leibovitch I. Combined analysis of morphology and fluorescence in

- situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urology*. 2005;66(6):1354–1359.
71. Moonen PMJ, Merks GFM, Peelen P, Karthaus HFM, Smeets DFJM, Witjes JA. UroVysion compared with cytology and quantitative cytology in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *European Urology*. 2007;51(5):1275–1280.
 72. Hosseini J, Golshan AR, Mazloomfard MM, Mehrsai AR, Zargar MA, Ayati M, Shakeri S, Jasemi M, Kabiri M. Detection of recurrent bladder cancer: NMP22 test or urine cytology? *Journal of Urology*. 2012;9(1):367–372.
 73. Srirangam SJ, Marri R, Crump A, Gunendran T, Neilson D. A prospective comparison of the NMP22 BladderChek® assay and voided urine cytology in the detection of bladder transitional cell carcinoma: Is it time up for urine cytology? *British Journal of Medical and Surgical Urology*. 2011;4(3):113–118.
 74. Frantzi M, Makridakis M, Vlahou A. Biomarkers for bladder cancer aggressiveness. *Current Opinion in Urology*. 2012;22(5):390–396.
 75. Meeks JJ, Bellmunt J, Bochner BH, Clarke NW, Daneshmand S, Galsky MD, Hahn NM, Lerner SP, Mason M, Powles T, Sternberg CN, Sonpavde G. A systematic review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *European Urology*. 2012;62(3):523–533.
 76. Van der Heijden AG, Witjes JA. Recurrence, Progression, and Follow-Up in Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *European Urology Supplements*. 2009;8(7):556–562.
 77. Serrano C, Morales R, Suárez C, Núñez I, Valverde C, Rodón J, Humbert J, Padrós O, Carles J. Emerging therapies for urothelial cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(4):311–317.
 78. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–674.
 79. Rivenbark AG, Stolzenburg S, Beltran AS, Yuan X, Rots MG, Strahl BD, Blancafort P. Epigenetic reprogramming of cancer cells via targeted DNA methylation. *Epigenetics*. 2012;7(4):350–360.
 80. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546–1558.
 81. Ganem NJ, Storchova Z, Pellman D. Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Current Opinion in Genetics Development*. 2007;17(2):157–162.

82. Lindgren D, Sjö Dahl G, Lauss M, Staaf J, Chebil G, Lövgren K, Gudjonsson S, Liedberg F, Patschan O, Månsson W, Fernö M, Höglund M. Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38863.
83. Hirsch D, Kemmerling R, Davis S, Camps J, Meltzer PS, Ried T, Gaiser T. Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Research*. 2013;73(5):1454–1460.
84. Kloosterman WP, Cuppen E. Chromothripsis in congenital disorders and cancer: similarities and differences. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013.
85. Cheng L, Davidson DD, Maclennan GT, Williamson SR, Zhang S, Koch MO, Montironi R, Lopez-Beltran A. The origins of urothelial carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2010;10(6):865–880.
86. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(12):e57.
87. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *The American Journal of Human Genetics*. 2010;86(5):749–764.
88. Chan MWY, Hui ABY, Yip SKH, Ng C-F, Lo KW, Tong JHM, Chan AWH, Cheung HY, Wong WS, Chan PSF, Lai FMM, To K-F. Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *International Journal of Oncology*. 2009;34(4):963–970.
89. Goebell PJ, Knowles MA. Bladder cancer or bladder cancers? Genetically distinct malignant conditions of the urothelium. *Urologic Oncology*. 2010;28(4):409–428.
90. Di Pierro GB, Gulia C, Cristini C, Fraietta G, Marini L, Grande P, Gentile V, Piergentili R. Bladder cancer: a simple model becomes complex. *Current Genomics*. 2012;13(5):395–415.
91. Cabello MJ, Grau L, Franco N, Orenes E, Alvarez M, Blanca A, Heredero O, Palacios A, Urrutia M, Fernández JM, López-Beltrán A, Sánchez-Carbayo M. Multiplexed

- Methylation Profiles of Tumor Suppressor Genes in Bladder Cancer. *The Journal of Molecular Diagnosis*. 2011;13(1):29–40.
92. Agundez M, Grau L, Palou J, Algaba F, Villavicencio H, Sanchez-Carbayo M. Evaluation of the methylation status of tumour suppressor genes for predicting bacillus Calmette-Guérin response in patients with T1G3 high-risk bladder tumours. *European Urology*. 2011;60(1):131–140.
93. Knowles MA, Platt FM, Ross RL, Hurst CD. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway activation in bladder cancer. *Cancer and Metastasis Review*. 2009;28(3-4):305–316.
94. Rebouissou S, Hérault A, Letouzé E, Neuzillet Y, Laplanche A, Ofualuka K, Maillé P, Leroy K, Riou A, Lepage M-L, Vordos D, de la Taille A, Denoux Y, Sibony M, Guyon F, Lebret T, Benhamou S, Allory Y, Radvanyi F. CDKN2A homozygous deletion is associated with muscle invasion in FGFR3-mutated urothelial bladder carcinoma. *The Journal of Pathology*. 2012;227(3):315–324.
95. Hernandez S, Muga S de, Agell L, Juanpere N, Esgueva R, Lorente JA, Mojal S, Serrano S, Lloreta J. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Modern Pathology*. 2009;22(6):848–856.
96. Guo Y, Chekaluk Y, Zhang J, Du J, Gray NS, Wu C-L, Kwiatkowski DJ. TSC1 involvement in bladder cancer: diverse effects and therapeutic implications. *The Journal of Pathology*. 2013;230(1):17–27.
97. Putnam DF. *Composition and Concentrative Properties of Human Urine*. National Aeronautics and Space Administration; 1971.
98. Reinert T. Methylation Markers for Urine-Based Detection of Bladder Cancer: The Next Generation of Urinary Markers for Diagnosis and Surveillance of Bladder Cancer. *Advances in Urology*. 2012;2012:1–11.
99. Goodison S, Rosser CJ, Urquidi V. Bladder cancer detection and monitoring: assessment of urine- and blood-based marker tests. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2013;17(2):71–84.
100. Hömig-Hölzel C, Savola S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2012;21(4):189–206.
101. MRC-Holland, MLPA Technology - MLPA an introduction. Proveniente de: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGIqYwxaGF9Y>. Visitado a: 20/06/2012.

102. Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. Methylation-Specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(14):e128.
103. MRC-Holland, MLPA Technology - Methylation-specific MLPA. Proveniente de: <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhmUCJLqQzwZq/fiQWQTnAP\0V13AZUzpnKmyAPu7IsFt>. Visitado a: 17/06/2012.
104. Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, Rodgers L, Brady A, Sebat J, Troge J, West JA, Rostan S, Nguyen KCQ, Powers S, Ye KQ, Olshen A, Venkatraman E, Norton L, Wigler M. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Research*. 2003;13(10):2291–2305.
105. Veltman JA, de Vries BBA. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? *The Journal of Molecular Diagnostic*. 2006;8(5):534–539.
106. Agilent Technologies, Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis. Proveniente de: http://www.chem-agilent.com/pdf/G4410-90020v3_1_CGH_ULS_Protocol.pdf. Visitado a: 19/06/2012.
107. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Molecular Human Reproduction*. 2004;10(4):283–289.
108. Chen AYY, Chen A. Fluorescence in situ hybridization. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013;133(5):e8.
109. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques*. 1995;18(1):62–63.
110. Khan MR, Badar I, Siddiquah A. Prevention of hepatorenal toxicity with *Sonchus asper* in gentamicin treated rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011;11(1):113.
111. Fu VX, Schwarze SR, Reznikoff CA, Jarrard DF. The Establishment and Characterization of Bladder Cancer Cultures In Vitro. In: Pfragner R, Freshney RI, eds. *Culture of Human Tumor Cells*. John Wiley & Sons, Inc.; 2005:97–123. Proveniente de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471722782.ch5/summary>. Visitado a: 22/05/2013.
112. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–174.

113. Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H, Hirao Y. Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. *BMC Cancer*. 2013;13(1):275.
114. Vecchione A, Seignani C, Giarnieri E, Zanasi N, Ishii H, Cesari R, Fong LYY, Gomella LG, Croce CM, Baffa R. Inactivation of the FHIT gene favors bladder cancer development. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(22):7607–7612.
115. Han S-Y, Iliopoulos D, Druck T, Guler G, Grubbs CJ, Pereira M, Zhang Z, You M, Lubet RA, Fong LYY, Huebner K. CpG methylation in the Fhit regulatory region: relation to Fhit expression in murine tumors. *Oncogene*. 2004;23(22):3990–3998.
116. Kandimalla R, van Tilborg AA, Zwarthoff EC. DNA methylation-based biomarkers in bladder cancer. *Nature Reviews Urology*. 2013;10(6):327–335.
117. López-Knowles E, Hernández S, Malats N, Kogevinas M, Lloreta J, Carrato A, Tardón A, Serra C, Real FX. PIK3CA mutations are an early genetic alteration associated with FGFR3 mutations in superficial papillary bladder tumors. *Cancer Research*. 2006;66(15):7401–7404.
118. Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Human Molecular Genetics*. 2013;22(4):795–803.
119. Dimashkieh H, Wolff DJ, Smith TM, Houser PM, Nietert PJ, Yang J. Evaluation of urovysion and cytology for bladder cancer detection: A study of 1835 paired urine samples with clinical and histologic correlation. *Cancer Cytopathology*. 2013.
120. Hess J, Thomas G, Braselmann H, Bauer V, Bogdanova T, Wienberg J, Zitzelsberger H, Unger K. Gain of chromosome band 7q11 in papillary thyroid carcinomas of young patients is associated with exposure to low-dose irradiation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*. 2011;108(23):9595–9600.
121. McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, Siefker-Radtke A, Dinney C, Czerniak B. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urologic Oncology*. 2010;28(4):429–440.
122. Chen Q-R, Bilke S, Wei JS, Greer BT, Steinberg SM, Westermann F, Schwab M, Khan J. Increased WSB1 copy number correlates with its over-expression which associates with increased survival in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(9):856–862.
123. Archange C, Nowak J, Garcia S, Moutardier V, Calvo EL, Dagorn J-C, Iovanna JL. The WSB1 gene is involved in pancreatic cancer progression. *PLoS ONE*. 2008;3(6):e2475.

124. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijzen S, Wesseling P. Multiplex ligation-dependent probe amplification: a diagnostic tool for simultaneous identification of different genetic markers in glial tumors. *The Journal of Molecular Diagnostic*. 2006;8(4):433–443.
125. Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, Wang X, Shen TH, Matos T, Shen MM, Cordon-Cardo C, Abate-Shen C. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. *Genes & Development*. 2009;23(6):675–680.
126. Shinohara A, Sakano S, Hinoda Y, Nishijima J, Kawai Y, Misumi T, Nagao K, Hara T, Matsuyama H. Association of TP53 and MDM2 polymorphisms with survival in bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Cancer Science*. 2009;100(12):2376–2382.
127. Da Silva GN, Evangelista AF, Magalhães DA, Macedo C, Búfalo MC, Sakamoto-Hojo ET, Passos GAS, Salvadori DMF. Expression of genes related to apoptosis, cell cycle and signaling pathways are independent of TP53 status in urinary bladder cancer cells. *Molecular Biology Reports*. 2011;38(6):4159–4170.
128. Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Lopez-Beltran A, Montironi R. Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice. *Human Pathology*. 2011;42(4):455–481.
129. Enokida H, Nakagawa M. Epigenetics in bladder cancer. *International Journal of Clinical Oncology*. 2008;13(4):298–307.
130. Kawakami T, Shiina H, Igawa M, Deguchi M, Nakajima K, Ogishima T, Tokizane T, Urakami S, Enokida H, Miura K, Ishii N, Kane CJ, Carroll PR, Dahiya R. Inactivation of the hMSH3 mismatch repair gene in bladder cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;325(3):934–942.
131. Skeldon SC, Semotiuk K, Aronson M, Holter S, Gallinger S, Pollett A, Kuk C, van Rhijn B, Bostrom P, Cohen Z, Fleshner NE, Jewett MA, Hanna S, Shariat SF, Van Der Kwast TH, Evans A, Catto J, Bapat B, Zlotta AR. Patients with Lynch syndrome mismatch repair gene mutations are at higher risk for not only upper tract urothelial cancer but also bladder cancer. *European Urology*. 2013;63(2):379–385.
132. Babjuk M, Soukup V, Mares J, Dusková J, Pecen L, Pesl M, Pavlík I, Dvorčák J. Association of PAX5 expression with clinical outcome in patients with TaT1 transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2006;67(4):756–761.

133. Thompson ER, Gorringer KL, Choong DYH, Eccles DM, kConFab, Mitchell G, Campbell IG. Analysis of KLLN as a high-penetrance breast cancer predisposition gene. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2012;134(2):543–547.
134. Koed K, Wiuf C, Christensen L-L, Wikman FP, Zieger K, Møller K, von der Maase H, Orntoft TF. High-density single nucleotide polymorphism array defines novel stage and location-dependent allelic imbalances in human bladder tumors. *Cancer Research*. 2005;65(1):34–45.
135. Höglund M. The bladder cancer genome; chromosomal changes as prognostic makers, opportunities, and obstacles. *Urologic Oncology*. 2012;30(4):533–540.
136. Nicholson JM, Cimini D. Cancer karyotypes: survival of the fittest. *Frontiers in Oncology*. 2013;3:148.
137. Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, Sjö Dahl G, Hallden C, Chebil G, Veerla S, Ryden T, Månsson W, Liedberg F, Höglund M. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Research*. 2010;70(9):3463–3472.
138. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*. 2010;2(1):a001008.
139. Neuzillet Y, Paoletti X, Ouerhani S, Mongiat-Artus P, Soliman H, de The H, Sibony M, Denoux Y, Molinie V, Herault A, Lepage M-L, Maille P, Renou A, Vordos D, Abbou C-C, Bakkar A, Asselain B, Kourda N, El Gaaied A, Leroy K, Laplanche A, Benhamou S, Lebret T, Allory Y, Radvanyi F. A meta-analysis of the relationship between FGFR3 and TP53 mutations in bladder cancer. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e48993.
140. Adachi H, Igawa M, Shiina H, Urakami S, Shigeno K, Hino O. Human bladder tumors with 2-hit mutations of tumor suppressor gene TSC1 and decreased expression of p27. *Journal of Urology*. 2003;170(2 Pt 1):601–604.
141. Pymar LS, Platt FM, Askham JM, Morrison EE, Knowles MA. Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms. *Human Molecular Genetics*. 2008;17(13):2006–2017.
142. Okuyama H, Yoshida T, Endo H, Nakayama M, Nonomura N, Nishimura K, Inoue M. Involvement of Heregulin/HER3 in the Primary Culture of Human Urothelial Cancer. *Journal of Urology*. 2013;190(1):302–310.

143. Seifert H-H, Meyer A, Cronauer M, Hatina J, Müller M, Rieder H, Hoffmann M, Ackermann R, Schulz W. A new and reliable culture system for superficial low-grade urothelial carcinoma of the bladder. *World Journal of Urology*. 2007;25(3):297–302.
144. Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Laboratory Investigation*. 1994;71(4):583–594.
145. Southgate J, Masters JRW, Trejdosiewicz LK. Culture of Human Urothelium. In: Freshney RI, Freshney ry G, eds. *Culture of Epithelial Cells*. John Wiley & Sons, Inc.; 2002:381–399. Proveniente de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471221201.ch12/summary>. Visitado a: 8/07/2013.
146. Petzoldt JL, Leigh IM, Duffy PG, Masters JR. Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro. *Urological Research*. 1994;22(2):67–74.
147. Reznikoff CA, Loretz LJ, Pesciotta DM, Oberley TD, Ignjatovic MM. Growth kinetics and differentiation in vitro of normal human uroepithelial cells on collagen gel substrates in defined medium. *Journal of Cellular Physiology*. 1987;131(3):285–301.
148. Pinkse GGM, Voorhoeve MP, Noteborn M, Terpstra OT, Bruijn JA, De Heer E. Hepatocyte survival depends on beta1-integrin-mediated attachment of hepatocytes to hepatic extracellular matrix. *Liver International*. 2004;24(3):218–226.
149. Campodonico F, Benelli R, Michelazzi A, Ognio E, Toncini C, Maffezzini M. Bladder cell culture on small intestinal submucosa as bioscaffold: experimental study on engineered urothelial grafts. *European Urology*. 2004;46(4):531–537.
150. Strefford JC, Lillington DM, Steggall M, Lane TM, Nouri AME, Young BD, Oliver RTD. Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2002;135(2):139–146.
151. Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Molecular Reproduction and Development*. 2008;75(5):818–827.
152. Dodurga Y, Avcı CB, Yılmaz S, Nazlı O, Coğulu O, Cankaya T, Gündüz C. UroVysion fluorescence in situ hybridization (UroVysion FISH) assay for detection of bladder cancer in voided urine of Turkish patients: a preliminary study. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*. 2013;17(2):156–160.

153. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008;112(13):4808–4817.
154. Riesz P, Lotz G, Páska C, Szendrői A, Majoros A, Németh Z, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, Romics I, Kiss A. Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique. *Pathology and Oncology Research*. 2007;13(3):187–194.



Capítulo VII

Anexos

Capítulo VII - Anexos

Anexo I: Protocolo de extracção de DNA de biópsias tumorais e de controlos pelo método *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

O método de extracção *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) requer a utilização de uma amostra de tecido com cerca de 25 a 50 ng de forma a garantir a perfeita execução do procedimento experimental. Amostras de tecido de grandes dimensões poderão levar à saturação da membrana de sílica e conseqüentemente ao comprometimento da amostra.

O procedimento experimental do referido *kit* de extracção inicia-se pela digestão do tecido e inactivação de endonucleases endógenas. Neste âmbito, o tecido é colocado em 200 µL de *lysis buffer* e 40 µL de *Proteinase K* (20mg/mL) e incubado a 55°C até que o tecido esteja digerido (entre 12 a 15 horas). Após a digestão, adicionam-se 200 µL de *binding buffer* e incubam-se as amostras a 70°C durante 10 min. Decorrido este período adicionam-se 100 µL de isopropanol. Neste fase do procedimento o DNA reúne as condições necessárias para que ocorra adesão à membrana de sílica ou seja, as cargas negativas do DNA estão disponíveis para interagir com as cargas positivas da membrana de sílica. Deste modo, o DNA fica retido na membrana permitindo assim a realização de várias etapas de lavagem e purificação dos ácidos nucleicos. Assim, o próximo passo consiste em transferir a amostra para a coluna que contém a membrana de sílica. Seguidamente centrifuga-se a amostra a 8 000 g durante 1 min. Depois adicionam-se 500 µL de *inhibitor removal buffer* e repete-se a centrifugação. Posteriormente inicia-se a etapa de lavagem que consiste na adição de 500 µL de *wash buffer* ao tubo com a membrana seguido de nova centrifugação a 8 000 g durante 1 min. Esta etapa é repetida uma vez. Com o objectivo de secar a membrana de sílica realiza-se uma nova centrifugação a 13 000 g durante 10 seg. No final, o DNA é eluído por acção de 100 µL de *elution buffer* previamente aquecido a 70°C. Para obtenção da amostra de DNA final centrifuga-se a 8 000 g durante 1 min.

Anexo II: Protocolo de Extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina pelo método *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).



O método de extração *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) requer a utilização de 140 μL de material biológico que é adicionado a 560 μL de *buffer AVL* de forma a ocorrer a lise celular e a inactivar RNases. Esta reacção ocorre à temperatura ambiente durante 10 min. Decorrido este período, adicionam-se 560 μL de etanol (96-100%) a cada amostra. O passo seguinte consiste na passagem das amostras para a respectiva coluna com a membrana. Inicialmente transferem-se 630 μL de solução para a coluna e de seguida centrifugam-se os tubos a 6 000 g durante 1 min. Devido ao elevado volume de amostra, é necessário repetir o passo anterior, incluindo a centrifugação. Posteriormente, iniciam-se as etapas de lavagem do DNA fixado à membrana. Numa primeira fase adicionam-se 500 μL de *buffer AW1* e centrifugam-se os *ependorfs* a 6 000 g durante 1 min. Numa segunda fase adicionam-se 500 μL de *buffer AW2* e centrifugam-se os tubos a 20 000 g durante 3 min. O *buffer AW2* quando em contacto com o tampão de eluição pode comprometer a qualidade do procedimento. Deste modo, realiza-se uma nova centrifugação à velocidade máxima durante 1 min para garantir que a membrana fica completamente seca. Para eluir o DNA adicionam-se 60 μL de *buffer AVE* a cada membrana e centrifugam-se os tubos a 6 000 g durante 1 min de forma a obter a amostra de DNA final.

Anexo III: Protocolo de Extracção de DNA de células uroteliais excretadas na urina pelo método *UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, California).

O método de extracção *UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, California) pode ser utilizado para extrair DNA de amostras de tecido, em que requer cerca de 1 a 25 mg de material biológico, ou para extrair DNA proveniente de culturas e suspensões celulares, necessitando de cerca de 5×10^6 células. O procedimento experimental para culturas e suspensões celulares inicia-se com a adição de 1 mL de solução *TD1* à suspensão celular. Seguidamente, o volume total de amostra é transferido para um tubo contendo a membrana que irá reter o DNA. Após este passo, os tubos são centrifugados a 10 000 g durante 30 seg. No passo seguinte adicionam-se 400 µL de solução *TD2* a cada tubo e centrifugam-se novamente a 10 000 g durante 30 seg. Para garantir a remoção completa da solução *TD2* volta-se a centrifugar os tubos a 10 000 g durante 1 min. No final, com o objectivo de eluir o DNA, adicionam-se 50 µL de solução *TD3* e centrifugam-se novamente os tubos a 10 000 g durante 30 seg. para obter a amostra de DNA final.

Anexo IV: Designação e localização dos genes estudados pelas técnicas de MLPA e MS-MLPA

Gene	Pos. Cromossómica ⁺	Designação
<i>TP73</i>	1p36.32	<i>tumor protein p73</i>
<i>COL11A1*</i>	1p21.1	<i>collagen, type XI, alpha 1</i>
<i>PPOX*</i>	1q23.3	<i>protoporphyrinogen oxidase</i>
<i>MDM4</i>	1q32.1	<i>Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)</i>
<i>MSH6</i>	2p16.3	<i>mutS homolog 6 (E. coli)</i>
<i>COL3A1*</i>	2q32.2	<i>collagen, type III, alpha 1</i>
<i>VHL</i>	3p25.3	<i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
<i>RARB</i>	3p24.2	<i>retinoic acid receptor, beta</i>
<i>FHIT</i>	3p14.2	<i>fragile histidine triad</i>
<i>ROBO1</i>	3p12.3	<i>roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)</i>
<i>EPHA3</i>	3p11.1	<i>EPH receptor A3</i>
<i>ARL13B</i>	3q11.1	<i>ADP-ribosylation factor-like 13B</i>
<i>CASR</i>	3q21.1	<i>calcium-sensing receptor</i>
<i>PIK3CA</i>	3q26.3	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
<i>FGFR3</i>	4p16.3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>IL2</i>	4q27	<i>interleukin 2</i>
<i>APC</i>	5q22.2	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>ESR1</i>	6q25.1	<i>estrogen receptor 1</i>
<i>GCK</i>	7p13	<i>glucokinase (hexokinase 4)</i>
<i>EGFR</i>	7p11.2	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>GBAS</i>	7p11.2	<i>glioblastoma amplified sequence</i>
<i>CLIP2</i>	7q11.23	<i>CAP-GLY domain containing linker protein 2</i>
<i>POR</i>	7q11.23	<i>P450 (cytochrome) oxidoreductase</i>
<i>CDK6</i>	7q21.2	<i>cyclin-dependent kinase 6</i>
<i>CFTR</i>	7q31.2	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)</i>
<i>CDKN2A</i>	9p21.3	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>CDKN2B</i>	9p21.3	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)</i>
<i>PAX5</i>	9p13.2	<i>paired box 5</i>
<i>PTCH1</i>	9q22.32	<i>patched 1</i>
<i>CREM</i>	10p11.21	<i>cAMP responsive element modulator</i>
<i>PTEN</i>	10q23.31	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>KLLN</i>	10q23.31	<i>killin, p53-regulated DNA replication inhibitor</i>
<i>MGMT</i>	10q26.3	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<i>SMPD1*</i>	11p15.4	<i>sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal</i>
<i>PAX6</i>	11p13	<i>paired box 6</i>

<i>WT1</i>	11p13	<i>Wilms tumor 1</i>
<i>CD44</i>	11p13	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>
<i>GSTP1</i>	11q13.2	<i>glutathione S-transferase pi 1</i>
<i>CCND1</i>	11q13.3	<i>cyclin D1</i>
<i>ATM</i>	11q22.3	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
<i>CADM1</i>	11q23.3	<i>cell adhesion molecule 1</i>
<i>VWF*</i>	12p13.31	<i>von Willebrand factor</i>
<i>COL2A1*</i>	12q13.11	<i>collagen, type II, alpha 1</i>
<i>MDM2</i>	12q15	<i>Mdm2, P53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)</i>
<i>PAH</i>	12q23.2	<i>phenylalanine hydroxylase</i>
<i>CHFR</i>	12q24.33	<i>checkpoint with forkhead and ring finger domain, E3 ubiquitin protein ligase</i>
<i>BRCA2</i>	13q13.1	<i>breast cancer 2, early onset</i>
<i>RB1</i>	13q14.2	<i>retinoblastoma 1</i>
<i>RPGRIP1*</i>	14q11.2	<i>retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1</i>
<i>MLH3</i>	14q24.3	<i>mutL homolog 3 (E. coli)</i>
<i>THBS1</i>	15q14	<i>thrombospondin 1</i>
<i>SPG11*</i>	15q21.1	<i>spastic paraplegia 11 (autosomal recessive)</i>
<i>TSC2</i>	16p13.3	<i>tuberous sclerosis 2</i>
<i>ABAT*</i>	16p13.2	<i>4-aminobutyrate aminotransferase</i>
<i>PYCARD</i>	16p11.2	<i>PYD and CARD domain containing</i>
<i>CDH13</i>	16q23.3	<i>cadherin 13, H-cadherin (heart)</i>
<i>TP53</i>	17p13.1	<i>tumor protein p53</i>
<i>PMP22</i>	17p12	<i>peripheral myelin protein 22</i>
<i>AKAP10</i>	17p11.2	<i>A kinase (PRKA) anchor protein 10</i>
<i>USP22</i>	17p11.2	<i>ubiquitin specific peptidase 22</i>
<i>WSB1</i>	17q11.1	<i>WD repeat and SOCS box containing 1</i>
<i>NOS2</i>	17q11.2	<i>nitric oxide synthase 2, inducible</i>
<i>ERBB2</i>	17q12	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
<i>BRCA1</i>	17q21.31	<i>breast cancer 1, early onset</i>
<i>STK11</i>	19p13.3	<i>serine/threonine kinase 11</i>
<i>SLC7A9*</i>	19q13.11	<i>solute carrier family 7 (glycoprotein-associated amino acid transporter light chain, bo, + system)</i>
<i>KLK3</i>	19q13.33	<i>kallikrein-related peptidase 3</i>
<i>AURKA</i>	20q13.2	<i>aurora kinase A</i>
<i>GATA5</i>	20q13.33	<i>GATA binding protein 5</i>
<i>HSPA13*</i>	21q11.2	<i>heat shock protein 70kDa family, member 13</i>
<i>LARGE*</i>	22q12.3	<i>like-glycosyltransferase</i>

(*) Sondas controlo; (†) p = braço curto, q = braço longo, nomenclatura de acordo com o ISCN 2013, ex.1p21.1 – corresponde ao cromossoma 1, braço curto, região 2, banda 1, sub-banda 1.

Anexo VI: Comunicações em formato de poster relacionadas com este trabalho

- ✓ **Santos J.D.**, Parada B., Ribeiro I.P., Ferrão J., Ferreira S.I., Reis F., Figueiredo A., Teixeira F., Mota A., Melo J.B., Carreira I.M. (2013) ‘Genomic profile of Bladder Cancer – Importance in diagnosis, follow-up and prognosis’, *1st reSEARCH Coimbra in Health Sciences, 19-21 de Abril, Coimbra, Portugal*