

**VALOR PROGNÓSTICO DE p_{hos}S6 E MODULAÇÃO
DA VIA mTOR EM PRODUTOS DE CISTECTOMIA**

LUCIANA SCHULTZ AMORIM

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares
Co-Orientador: Dr Luiz Fernando Onuchic**

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Schultz, Luciana

Valor prognóstico de phosS6 e modulação da via mTOR em produtos de cistectomia / Luciana Schultz – São Paulo, 2015.

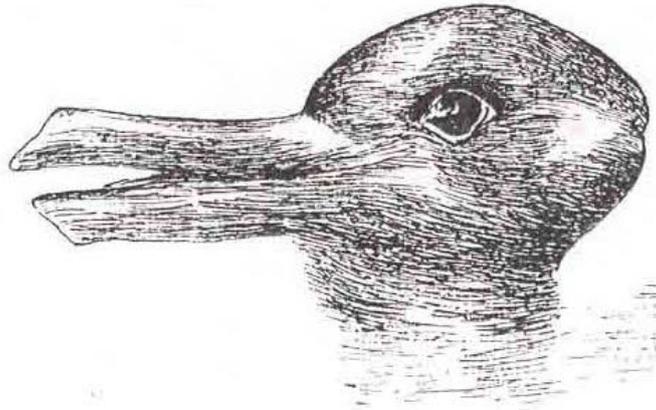
102p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CARCINOMA. 2. NEOPLASIAS DA BEXIGA URINÁRIA. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. MICRORNAS/genética. 5. PROGNÓSTICO 6. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 7. SERINA-TREONINA QUINASES TOR.



“A percepção da anomalia – isto é, de um fenômeno para o qual o paradigma não prepara o investigador – desempenhou um papel essencial na iniciação do caminho que permitiu a percepção da novidade. (...) Embora o mundo não mude com a mudança de um paradigma, depois dela, o cientista trabalha em um mundo diferente”.

Khun T. **A estrutura das revoluções científicas**. 5ª ed. São Paulo: Editora Perspectiva; 1998. p.257.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus filhos, Elisa e Mathias, que motivam tudo de belo que sou capaz de produzir, mesmo antes de chegarem.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi possível devido à contribuição do Dr. Fernando Augusto Soares, meu orientador, e o incentivo da Dra Maria Inês Onuchic Schultz, minha inspiração.

Agradeço o Dr. Luiz Fernando Onuchic, meu co-orientador, e Isac de Castro (análises da expressão proteica e gênica e sobrevida), da Universidade de São Paulo, por acrescentar elegância à pesquisa.

A motivação pelo tema do trabalho, tendo sido fruto da minha experiência profissional no departamento de Anatomia Patológica do hospital da Johns Hopkins, merece ser creditada ao Dr. George Jaboure Netto, meu mentor na uropatologia e também na metodologia científica.

Estendo o agradecimento ao Dr Fernando a todos aqueles a mim apresentados por ele: Dra. Cláudia Camillo (experimental), Giley Raimundo Damm (construção da coorte), Dr Samuel Spagnul (coleta de dados clínicos), Renato Puga (análise estatística dos miRNAs), Ivan Neves e Suely Nonogaki (padronização de anticorpos) e os queridos colegas do departamento de Anatomia Patológica e departamento de Urologia e Cirurgia Pélvica do A.C. Camargo Cancer Center, assim como os funcionários da Pós Graduação da Fundação Antonio Prudente.

Estendo o agradecimento à Dra Maria Inês, minha mãe, ao meu pai Werner Schultz, tanto pelo suporte durante o período da pesquisa - e aí incluo os colegas médicos e funcionários do Instituto de Anatomia Patológica - como pela valorização da Ciência, que foi construída em mim e meus irmãos desde o nosso nascimento.

Nesse contexto, reconheço e agradeço a influência da Dra Lourdes de la Rosa Onuchic e Dr Nelson Onuchic (*in memorium*), meus avós, cuja história de vida motiva a iniciativa desta pesquisa e de inúmeras outras na nossa família, tanto de gerações já bem estabelecidas, nas áreas de ciências exatas e biológicas, quanto de instigantes contribuições da nova geração, muitas delas desenvolvidas nessa interface.

Por fim, agradeço o meu marido Ivan Gerage Amorim pela generosa curiosidade em entender e acompanhar o meu trabalho.

RESUMO

Schultz L. **Valor prognóstico de phosS6 e modulação da via mTOR em produtos de cistectomia.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Introdução: O carcinoma urotelial da bexiga é uma doença de alta incidência e letalidade. Em tumores avançados, há indicação de quimioterapia com agentes convencionais, porém a sobrevida global em 5 anos não excede 15%. A via mTOR é essencial para vários processos celulares, incluindo metabolismo, proliferação, angiogênese e diferenciação celular, e, estando alterada em mais de 40% dos tumores uroteliais, representa uma opção atraente para inibição farmacológica. No entanto, até o momento, os ensaios clínicos não têm desempenhado de forma satisfatória, o que se atribui à falta de critérios robustos para definição terapêutica e a particularidades de sua patogênese, as quais incluem retroalimentações da própria via, desta com outras vias essenciais e regulações pós-transcricionais críticas.

Metodologia: Analisamos a expressão proteica (imunoistoquímica, n=101) e gênica (RT-PCR, n=78) de diversos componentes da via mTOR e de suas principais vias interativas (via induzida por hipóxia e ciclo celular), assim como o perfil de expressão de miRNAs (n=72), em amostras neoplásicas e não-neoplásicas obtidas de pacientes submetidos a cistectomia. A expressão proteica e gênica dos tumores foi quantificada em relação às de amostras não-neoplásicas, enquanto a interação entre genes e entre proteínas foi avaliada através de análise dendrológica. Para a análise das relações entre expressão proteica e gênica, a expressão proteica foi categorizada por meio de análise por cluster seguida de curva ROC e a expressão gênica foi transformada em escore através de lógica *fuzzy*. Os valores de expressão de miRNAs foram comparados por teste t, partindo das categorias criadas para phosS6 (Ser 235/236), seguido-se de análise por *cluster*.

Resultados: As amostras neoplásicas mostraram níveis reduzidos de expressão proteica e gênica dos componentes da via mTOR em relação às amostras não-neoplásicas, sugerindo que essa via esteja constitutivamente ativada no urotélio não neoplásico e que a perda da sua expressão esteja relacionada ao processo tumorigênico em carcinomas uroteliais. A partir da

análise dendrológica, identificou-se uma correlação entre *PTEN* e *HIF1* em amostras tumorais, sugerindo interação entre a via mTOR e a via induzida por hipóxia nos carcinomas uroteliais. Não foi observada correlação direta entre os genes e suas proteínas correspondentes, exceto entre *AKT1* e phosAKT. As expressões de algumas proteínas, contudo, relacionaram-se à atividade transcricional de genes da via mTOR, incluindo phosAKT e phosS6. Foram identificados 17 miRNAs diferencialmente expressos entre tumores pertencentes às diferentes categorias de expressão de phosS6, organizados em 3 grupos pela análise por *cluster*. Sete/8 tumores com maiores níveis de expressão de phosS6 foram classificados no mesmo *cluster*, associado a morfologia bem diferenciada e prognóstico favorável. Na coorte como um todo, a expressão de phosS6 revelou-se um fator prognóstico favorável quanto à sobrevida doença específica ($p=0,030$). **Conclusões:** A expressão proteica e gênica de componentes da via mTOR mostrou-se diminuída nos tumores em comparação com o urotélio não neoplásico, enquanto sua interação com a via induzida por hipóxia parece ocorrer apenas em situação patológica. Nossos achados apoiam o uso de inibidores de mTOR em carcinoma urotelial de bexiga e sugerem que a combinação com anti-angiogênicos possa ser benéfica. A expressão do efetor da via mTOR, phosS6, associa-se a prognóstico favorável no carcinoma urotelial; a manutenção de sua expressão, por sua vez, associa-se a hiporregulação de alguns miRNAs e a uma maior diferenciação celular das células neoplásicas.

SUMMARY

Schultz L. [phosS6 prognostic value and mTOR pathway modulation in cystectomy specimens]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Introduction: Urothelial carcinoma of the bladder is highly incident and lethal. In advanced disease, conventional chemotherapy may be applied, but overall 5-year survival does not exceed 15%. The mTOR pathway is essential to many cellular processes, including metabolism, proliferation, angiogenesis and cell differentiation and, since it is altered in > 40% of urothelial tumors, it represents an attractive target for pharmacological inhibition. However, clinical trials have not yielded exciting results, which is attributed to the lack of robust criteria for therapeutic definition and particularities of its pathogenesis, represented by feedback mechanisms along the pathway itself and with other essential pathways, as well as critical post-transcriptional regulation steps. **Methods:** Protein and gene expression of mTOR pathway members and its interacting pathway components (hypoxia-inducible pathway and cell cycle) were analyzed by IHC (n=101), RT-PCR (n=78) and miRNA profiling (n=72), in neoplastic and non-neoplastic samples obtained from patients submitted to cystectomy. Gene and protein expression were quantified relatively to non-neoplastic urothelial tissue and interaction between the genes and between the proteins was analyzed using dendrograms. To study how alterations in protein expression relate to changes in gene expression, categorical variables were created for IHC quantification (cluster analysis followed by ROC curve) and a score was developed for mRNA expression levels, based on fuzzy logic. miRNA expression was compared between different categories created for phosS6 (Ser 235/236) expression, using *t*-test followed by cluster analyses. **Results:** Compared to non-neoplastic urothelium, tumor samples showed reduction in gene and protein expression levels of mTOR pathway members, suggesting that mTOR pathway is constitutively activated in the normal urothelium and that reduction of its expression may be related to urothelial oncogenesis. Dendrogram analyses identified a *PTEN*-

HIF1A correlation, characteristic of malignancy, suggesting that there is interaction between mTOR and hypoxia-inducible pathways in urothelial carcinomas. There was no correlation between individual genes and their corresponding proteins, except for *AKT1* and phosAKT. However, expression of individual proteins did relate to transcriptional activity of non-corresponding genes of the mTOR pathway, including phosAKT and phosS6. There were 17 differentially expressed miRNAs between the tumors stratified according to phosS6 expression, which were classified in 3 main groups by cluster analysis. Seven/8 tumors with higher levels of phosS6 belonged to the same cluster, which was associated with well-differentiated morphology and favorable prognosis. In the 101-patient cohort, phosS6 expression was a favorable predictor of disease specific survival ($p=0.030$). **Conclusion:** Gene and protein expression of mTOR pathway members was reduced in tumors compared to non-neoplastic urothelium, however interaction with hypoxia-inducible pathway seems to occur only in a pathological context. Taken together, our results support the use of mTOR inhibitors in urothelial carcinoma and suggest that their combination with anti-angiogenic agents might be beneficial. Expression of the mTOR pathway effector phosS6 is associated with a favorable prognostic value in urothelial carcinoma; maintenance of its expression, in turn, is associated with down-regulation of specific miRNAs and higher differentiation of the neoplastic cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Figura esquemática das duas vias de oncogênese urotelial.....	6
Figura 2	Figura esquemática da via mTOR e suas principais interações, ilustrando as vias de ativação e retroalimentação entre as proteínas e genes estudados neste trabalho.....	14
Figura 3	Figura expositiva dos ensaios clínicos com inibidores da via mTOR, com as suas respectivas indicações e resultados	24
Figura 4	Esquema de elaboração da coorte de estudo, com critérios de inclusão e exclusão, mostrando os números finais de amostras disponíveis para cada tipo de plataforma utilizada no estudo	27
Figura 5	<i>Scanner</i> das lâminas histológicas de TMA e recortes inteiros.....	35
Figura 6	Reprodução gráfica da placa comercial contendo os miRNAs utilizados neste trabalho.....	43
Figura 7	Análise dendrológica entre os níveis de expressão gênica em tumores (n=78), considerando os genes relacionados à via mTOR, via induzida por hipóxia e ciclo celular/apoptose.....	49
Figura 8	Gráfico de dispersão entre os valores de expressão gênica de <i>PTEN</i> e <i>HIF1</i> e coeficiente de correlação de Pearson	49
Figura 9	Fotografias por microscopia ótica, aumento de 40x. Expressão imunistoquímica das proteínas relacionadas ao ciclo celular, em amostras de tumores uroteliais	51

Figura 10	Fotografias por microscopia ótica, aumentos de 10x e 40x. Expressão imunoistoquímica de PTEN em amostras tumorais e periféricas.....	52
Figura 11	Fotografias por microscopia ótica, aumento de 10x. Expressão imunoistoquímica de phosAKT em amostras tumorais e periféricas...	53
Figura 12	Fotografias por microscopia ótica, aumentos de 10x e 40x. Expressão imunoistoquímica de phosS6 em amostras tumorais e periféricas.....	54
Figura 13	Fotografias por microscopia ótica, aumentos de 10x e 40x. Expressão imunoistoquímica de HIF1- α em amostras tumorais e periféricas.....	55
Figura 14	Fotografias por microscopia ótica, aumento de 40x. Expressão imunoistoquímica de VEGF em amostras tumorais e periféricas.....	56
Figura 15	Análise dendrológica entre os níveis de expressão proteica em urotélio periférico, considerando as proteínas relacionadas à via mTOR, via induzida por hipóxia e ciclo celular/ apoptose.....	58
Figura 16	Análise dendrológica utilizando a subtração dos valores de expressão proteica, considerando proteínas relacionadas à via mTOR, via induzida por hipóxia e ciclo celular/apoptose.....	59
Figura 17	Gráfico de dispersão entre PTEN e HIF-1 α , utilizando valores de expressão proteica.....	60
Figura 18	Plotagem do escore de expressão gênica, de acordo com a expressão proteica categorizada de phosS6.....	62

Figura 19	Matriz de casos e miRNAs diferencialmente expressos entre tumores com expressão negativa, baixos níveis e altos níveis de phosS6.....	64
Figura 20	Tempo de seguimento de acordo com óbito geral.....	67
Figura 21	Curva de sobrevida doença específica pela análise de Kaplan Meyer, avaliando o impacto do uso de tabaco na coorte de estudo.....	70
Figura 22	Curva de sobrevida doença específica pela análise de Kaplan Meyer avaliando o impacto do <i>status</i> das margens cirúrgicas na coorte de estudo.....	70
Figura 23	Curva de sobrevida doença específica pela análise de Kaplan Meyer avaliando o impacto da expressão de phosS6 na coorte de estudo.....	71

LISTA DE QUADROS S E TABELAS

Quadro 1	Classificação TNM/2009 dos tumores de bexiga, da União Internacional Contra o Câncer.....	3
Quadro 2	Anticorpos primários (imunoistoquímica) utilizados para acessar a expressão proteica, com as respectivas referências e dados de padronização.....	36
Tabela 1	Distribuição categórica dos parâmetros clínicos e evolutivos da coorte de 101 pacientes tratados por cistectomia.....	30
Tabela 2	Distribuição categórica dos parâmetros relacionados a diagnósticos e terapias prévios à cirurgia	31
Tabela 3	Distribuição categórica dos parâmetros anatomopatológicos da coorte de 101 pacientes tratados por cistectomia.....	33
Tabela 4	Valores de expressão para cada gene, em amostras tumorais e de tecido urotelial periférico e escore de expressão gênica.....	47
Tabela 5	Valores de expressão proteica em amostras tumorais e urotélio periférico, valores de subtração da expressão proteica, e distribuição do número de pacientes em cada categoria criada.....	57
Tabela 6	Valores do escore de expressão gênica, de acordo com a expressão proteica categorizada de phosS6.....	62
Tabela 7	Características clinico-patológicas entre os pacientes classificados no <i>cluster</i> III, em comparação com os demais pacientes (<i>cluster</i> I + <i>cluster</i> II).....	65

Tabela 8	Variáveis clínicas, patológicas e de expressão proteica, candidatas ao modelo proporcional de Cox, que apresentaram impacto na sobrevida doença específica (Kaplan-Meyer; $p < 0,2$).....	68
Tabela 9	Análise de regressão de Cox (stepwise), com variáveis independentes, após etapas de análise dos parâmetros clínicos, patológicos e de expressão proteica.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	Proteína ligante 4E do fator de iniciação de tradução eucariótica
AKT	Quinase serina/treonina AKT
ASA	<i>American Society of Anesthesiology</i>
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CIS	Carcinoma urotelial <i>in situ</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	Quinase ciclina-dependente
CNA	Alteração no número de cópias
eIF-4E	Fator de iniciação 4E da tradução eucariótica
ERK	Quinase regulada por sinalização extracelular
FDA	<i>Foods and Drugs Administration</i>
FGFR3	Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
Foxo3a	<i>Forkhead box O3</i>
GAP	Proteína ativadora de GTPase
H&E	Hematoxilina e eosina
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HIF-1α	Fator 1 α de transcrição induzida por hipóxia
IHC	Imunoistoquímica
IRS-1	Substrato 1 do receptor de insulina
LST8	Subunidade LST8 do complexo mTOR
MAPK	Proteína-quinases ativadas por mitógenos
MDM2	<i>Murine double minute 2 protein</i>
MI-OC	Músculo-invasivo órgão confinado
MI-NOC	Músculo-invasivo não órgão confinado
miRNA	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro
MS6K	Quinase multipotencial S6
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1/2	Complexos 1 e 2 de mTOR

NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NMI	Não músculo-invasivo
phosS6	Proteína ribossomal S6 fosforilada
PIK3	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PIKK	Quinases relacionadas à fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	3'-hidroxil de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PRAS40	40 kDa <i>Pro-rich AKT substrate</i>
PTEN	Supressor tumoral homólogo à fosfatase/tensina
Raptor	<i>Regulatory associated protein of mTOR</i>
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
Rictor	<i>Rapamycin-independent companion of mTOR</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPS6	Proteína ribossomal S6
RSK	90kDa <i>ribosomal S6 kinase</i>
RTK	Receptores de tirosina-quinase
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RTU	Ressecção transuretral
S6K	Quinase serina/treonina
TCR	Receptores de células T
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TOR	Alvo da rapamicina
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular-endotelial

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O carcinoma urotelial de bexiga	1
1.2	Alterações moleculares no carcinoma urotelial de bexiga.....	5
1.3	A via mTOR e a interação com outras vias regulatórias.....	10
1.4	Alterações da via mTOR no carcinoma urotelial de bexiga	16
1.5	miRNAs no carcinoma urotelial de bexiga.....	19
1.6	O tratamento do carcinoma urotelial de bexiga	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral.....	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	DESENHO EXPERIMENTAL	26
3.1	Pacientes.....	26
3.1.1	Elaboração da coorte de estudos	26
3.1.2	Processamento e anotação anatomopatológica	27
3.1.3	Obtenção dos dados clínicos	28
3.1.4	Caracterização clínica da coorte	29
3.1.5	Caracterização anatomopatológica da coorte.....	32
3.2	Materiais e Métodos.....	34
3.2.1	Construção das lâminas histológicas de TMA em carcinomas invasivos e dos recortes integrais em carcinomas não músculo-invasivos.....	34
3.2.2	Imunoistoquímica.....	35
3.2.2.1	Reações imunoistoquímicas	35
3.2.2.2	Quantificação da expressão proteica.....	37
3.2.3	Extração do RNA e Tratamento com DNase para RT-PCR.....	38
3.2.4	Expressão gênica.....	39
3.2.4.1	Síntese de cDNA e ensaio de RT-PCR para mRNA.....	39
3.2.4.2	Quantificação da expressão gênica	40
3.2.5	Expressão de miRNAs	41

3.2.5.1	Síntese de cDNA e ensaio de RT-PCR para miRNA	41
3.2.5.2	Análise da expressão de miRNAs.....	42
3.2.6	Metodologia Estatística.....	44
4	RESULTADOS	47
4.1	Expressão gênica.....	47
4.1.1	Análise descritiva da expressão gênica.....	47
4.1.2	Análise dendrológica da expressão gênica.....	48
4.2	Expressão proteica	50
4.2.1	Análise descritiva da expressão proteica	50
4.2.2	Análise dendrológica da expressão proteica	58
4.3	Correlação entre a expressão proteica e a expressão gênica.....	61
4.4	Perfil de expressão de miRNAs de acordo com a expressão de phosS6.....	63
4.4.1	miRNAs diferencialmente expressos entre as categorias de expressão de phosS6.....	63
4.4.2	Caracterização clínico-patológica dos <i>clusters</i> formados.....	65
4.5	Valor prognóstico da expressão das proteínas e genes estudados	66
5	DISCUSSÃO.....	72
6	CONCLUSÕES	83
7	REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

APÊNDICES

Apêndice 1 Correlação entre valores de expressão proteica e gênica

Apêndice 2 Distribuição das categorias de expressão proteica e estadiamento

Apêndice 3 Análise canônica

ANEXOS

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

Anexo 2 Resumos apresentados em Congresso Internacional

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

O carcinoma urotelial é o resultado da transformação neoplásica do epitélio de revestimento do trato urinário, podendo ocorrer da pelve renal à uretra distal, sendo mais comum na bexiga. Além de compor a maior porcentagem da área de revestimento urotelial, o urotélio vesical recebe uma exposição mais prolongada à urina e potenciais toxinas, dada sua função de reservatório. A etiologia do carcinoma urotelial associa-se principalmente à inflamação crônica e ao tabagismo. Embora unificado em uma categoria histológica, trata-se de uma doença heterogênea. As lesões “superficiais” (não músculo-invasivas) têm comportamento recidivante, mas são passíveis de ressecção local endoscópica por via transuretral. As lesões que invadem a parede muscular (músculo-invasivas), por sua vez, são agressivas e geralmente tratadas por cistectomia.

A cistoscopia consiste na avaliação endoscópica da cavidade vesical. Durante este procedimento, o urologista tem a oportunidade de inspecionar visualmente o urotélio e eventuais lesões tumorais, podendo optar por uma ressecção transuretral (RTU), a qual é encaminhada para análise anatomopatológica. Este tipo de biópsia tem finalidade diagnóstica mas também terapêutica, especialmente no caso das lesões não músculo-invasivas. A cistoscopia também é o procedimento padrão-ouro atual para o seguimento desses pacientes, sendo necessária em todos os casos, uma vez que 60% das lesões recorrem, como carcinoma não músculo-invasivo, e 10-20% progredem para

carcinoma músculo-invasivo (LOPEZ-BELTRAN et al. 2004; REUTER VE et al. 2006; CORDON-CARDO et al. 2008).

As decisões clínicas são baseadas na graduação histológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1998, modificada em 2004, auferida pelo resultado anatomopatológico da biópsia (LOPEZ-BELTRAN et al. 2004) e no estadiamento patológico (Quadro 1), considerando o contexto clínico do paciente. Contudo, apesar de sua baixa morbidade, a modalidade de biópsia por RTU pode apresentar problemas importantes, relacionados a vieses de representatividade. Estes problemas potenciais podem ser devidos a: a) fulguração do material pela alça de ressecção; b) inviabilidade de prosseguir além da camada muscular própria da bexiga (impossibilidade de amostrar o tecido adiposo perivesical devido ao risco de perfuração do órgão); e c) inexistência de margens cirúrgicas avaliáveis devido à fragmentação da lesão para extraí-la por via uretral.

Quadro 1 – Classificação TNM/2009 dos tumores de bexiga, da União Internacional Contra o Câncer

T- Tumor primário	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma in situ: “tumor plano”
T1	Tumor que invade até o tecido conjuntivo sub-epitelial
T2	Tumor que invade o músculo detrusor (camada muscular própria)
T2a	Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna)
T2b	Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido adiposo perivesical
T3a	Tumor que invade o tecido adiposo perivesical microscopicamente
T3b	Tumor que invade o tecido adiposo perivesical macroscopicamente (massa extra vesical)
T4	Tumor que invade outros órgãos pélvicos: próstata, útero, vagina, parede pélvica/ abdominal
T4a	Tumor que invade próstata, útero ou vagina
T4b	Tumor que invade parede pélvica ou abdominal
N- Gânglios linfáticos	
N1	Metástase em um único gânglio na pelve menor (hipogástrica, obturatória, ilíaca externa ou pré-sacral)
N2	Metástase em múltiplos gânglios na pelve menor (hipogástrica, obturatória, ilíaca externa ou pré-sacral)
N3	Metástase em gânglio da cadeia ilíaca comum
M- Metástase à distância	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: Modificado a partir de EDGE et al. (2010)

Devido às limitações da biópsia por RTU, o índice de sub-estadiamento (comparação entre o estadiamento clínico pré-operatório e a análise integral da peça cirúrgica) varia de 42% a 80%, mesmo com o acréscimo das informações de exames de imagem e dados clínicos (MEHRSAI et al. 2003). Sistemas de graduação de risco e nomogramas podem incrementar a precisão diagnóstica em até 80%, utilizando dados clínico-patológicos disponíveis para a decisão terapêutica ainda no momento pré-operatório (SYLVESTER et al. 2006; XIE et al. 2012, GREEN et al. 2013). As variáveis incluem dados demográficos (idade, sexo), dados relacionados à cistoscopia (massa palpável sob relaxamento anestésico, quantidade de RTU prévias e tamanho da lesão), dados imagenológicos (hidronefrose, sugestão tomográfica de invasão de linfonodos ou de tecido adiposo perivesical) e, finalmente, dados referentes à análise

anatomopatológica da biópsia por RTU (estadiamento patológico, graduação, identificação de histologia agressiva, invasão vascular ou de carcinoma urotelial *in situ* na mucosa adjacente ao tumor). Esta variedade reflete o valor preditivo limitado das variáveis individualmente e aponta a necessidade de parâmetros com *performance* mais robusta, em particular marcadores moleculares que possam ser explorados diretamente do tecido tumoral, ou ainda de fontes menos invasivas, como urina ou sangue periférico.

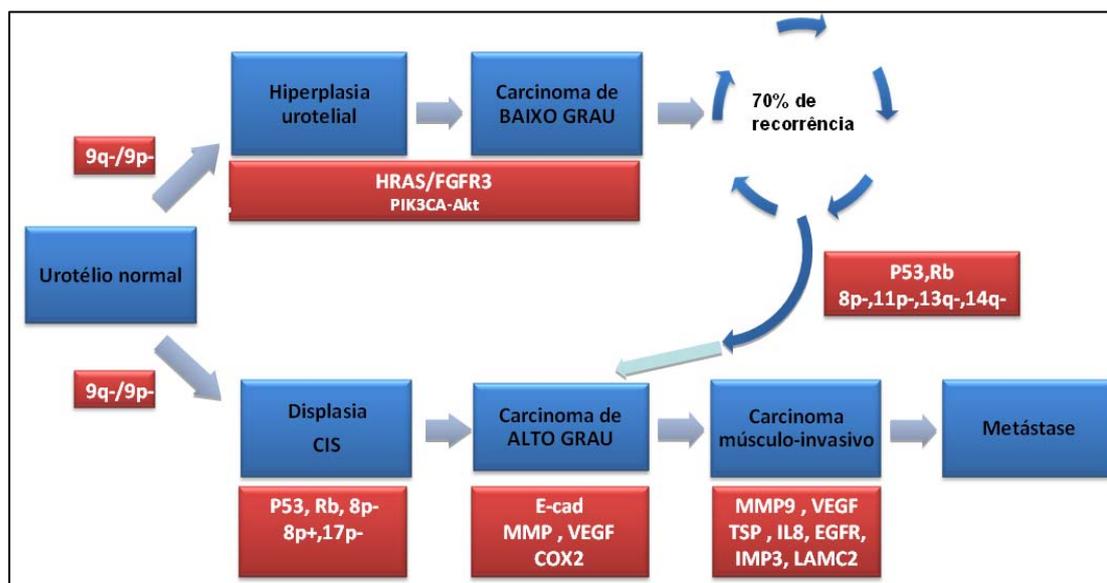
O nível de diferenciação de um tumor representa um dos principais fatores prognósticos. Carcinomas não músculo-invasivos frequentemente são multifocais e apresentam morfologia bem diferenciada, representada por arquitetura papilífera, sendo que o alto grau histológico e a presença de áreas menos diferenciadas – cuja terminologia corresponde às “variantes histológicas agressivas” – representam fatores prognósticos adversos. Outros parâmetros relacionados à progressão para carcinoma músculo-invasivo incluem a presença e a profundidade de áreas de invasão da lâmina própria ou de vasos linfáticos, envolvimento da mucosa vesical adjacente, do ureter ou de ductos prostáticos por carcinoma urotelial *in situ*, tumores maiores de 3 cm ou multifocais ou muito extensos, falha de resposta à terapia intravesical, recorrência em tempo menor que seis meses e tempo de duração da doença desde os primeiros sintomas (SOLOWAY et al. 2002; O’DONNELL et al. 2007).

Os carcinomas músculo-invasivos geralmente são pouco diferenciados, predominando arquitetura não-papilífera, com alta frequência de diferenciação escamosa e variantes histológicas agressivas. Dentre os fatores prognósticos mais importantes para carcinomas músculo-invasivos, destacam-se os antecedentes no momento do diagnóstico (*de novo* ou relacionado à progressão de lesão não músculo-invasiva prévia), o estadiamento patológico (TNM), invasão vascular e linfonodal e o

status das margens cirúrgicas (CORRADI et al. 2009). Dados os altos índices de mortalidade e letalidade do carcinoma urotelial músculo-invasivo e o baixo impacto dos parâmetros prognósticos atualmente utilizados, avanços na área de biomarcadores relacionados à doença são imperativos, em especial aqueles que orientem a indicação de tratamento adjuvante e a seleção dos pacientes para terapias personalizadas.

1.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

As variações no comportamento biológico de carcinomas não músculo-invasivos e músculo-invasivos também se associam a diferentes vias oncogênicas (WU et al. 2005) (Figura 1). Enquanto as lesões não músculo-invasivas relacionam-se primordialmente com mutações de ganho de função em oncogenes, como *H-RAS* e *FGFR3* (receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos), o carcinoma *in situ* e o músculo-invasor costumam apresentar mutações de perda de função em genes de supressão tumoral, como o supressor tumoral homólogo à fosfatase/tensina (*PTEN*) e *TP53*. O potencial invasivo do carcinoma urotelial parece depender da inativação conjunta de *PTEN* e *TP53* (PUZIO-KUTER et al. 2009).



Fonte: Adaptado de WU et al. (2005).

Figura 1 – Figura esquemática das duas vias de oncogênese urotelial. Enquanto as lesões não músculo-invasivas apresentam comportamento recidivante e relacionam-se com mutações de ganho de função em oncogenes (*H-RAS/FGFR3*), o carcinoma *in situ* e o músculo-invasor apresentam mutações de perda de função em genes de supressão tumoral (*P53, Rb*). Lesões não músculo-invasivas ocorrem com frequência e podem progredir quando acumulam mutações relacionadas ao potencial invasivo.

Alterações cromossômicas, em especial no cromossomo 9, estão entre os eventos genéticos mais precoces de ambas as vias oncogênicas do carcinoma urotelial. Especula-se que interfiram na estabilidade genética das células, permitindo o subsequente acúmulo de defeitos. Entre as mais frequentes estão ganhos em 3q, 7p e 17q e deleções em 9p21 (WU et al. 2005). Essas alterações podem ser exploradas diretamente na urina, de forma não invasiva e independente do procedimento de cistoscopia, através de ensaios por fluorescência *in situ* (FISH) de múltiplos alvos. Tais procedimentos podem ser empregados para seguimento de pacientes já diagnosticados com tumores não músculo-invasivos e para *screening* de pacientes de alto risco com sintomas de hematúria. Um teste comercial baseado nesse princípio é aprovado pelo

FDA já se encontra disponível, sendo utilizado em combinação com citologia urinária convencional (SKACEL et al. 2003; YODER et al. 2007).

A hipermetilação de promotores em ilhas CpG levam ao silenciamento transcricional dos genes correspondentes. No carcinoma urotelial, a metilação ocorre de maneira consistente no gene *RASSF1A*, impedindo seu efeito modulador sobre o gene *HRAS* ativado. Curiosamente, apesar de alterações em *TP53* estarem presentes em até 50% dos carcinomas uroteliais invasivos, não há evidência, até o momento, de hipermetilação do promotor de *TP53* (CATTO et al. 2005; YATES et al. 2007).

Em condições fisiológicas, *TP53* age como um “guardião” do DNA, inibindo a progressão do ciclo celular na transição G1-S; exerce, assim, um papel importante na estabilidade genômica das células uroteliais. Mutações no gene resultam no acúmulo de proteína p53 anômala, que apresenta boa correlação com a detecção imunohistoquímica de superexpressão nuclear de p53 (SARKIS et al. 1993, 1994). Vários estudos demonstraram valor prognóstico independente deste achado para a predição de progressão e sobrevida doença específica em carcinomas de alto grau (DALBAGNI et al. 1993; SARKIS et al. 1995; GARCIA DEL MURO et al. 2004; TZAI et al. 2004). Ademais, a via pode ser inativada mesmo na ausência de mutação de *TP53*, por meio da superexpressão da oncoproteína codificada por *MDM2* (*murine double minute 2 protein*), que é capaz de inativar a forma selvagem de p53. Em concordância, a superexpressão de *MDM2* também tem sido associada com carcinomas músculo-invasivos (MALUF et al. 2006). Em estudos clássicos, foi demonstrado efeito prognóstico sinérgico da combinação de alterações de expressão de p53 com outras proteínas do ciclo celular, como pRb, p21 e p27 (CHATTERJEE et al. 2004; SHARIAT et al. 2007). Contudo, esses achados não têm ocupado espaço relevante na prática clínica.

Alterações em moléculas de adesão como E-caderina e N-caderina, associadas à via oncogênica invasiva, têm sido reportadas com frequência, revelando participação do microambiente tumoral e fatores epigenéticos nesse processo. A perda de E-caderina e a expressão de metaloproteinases como MMP9, documentadas na maior parte dos carcinomas músculo-invasivos de alto grau, associam-se à progressão quando detectados em carcinomas não músculo-invasivos (LIN et al. 2006, LASCOMBE et al. 2006). Recentemente, foram descritas mutações em genes associados à regulação de histonas e remodelamento de cromatina, como *KDM6A*, *CREBBP*, *EP300* e *ARID1A*, em 59% a 89% dos tumores operados por cistectomia (GUI et al. 2011, Cancer Genome Atlas Research Network 2014).

Visando a traçar um perfil integrado deste complexo cenário molecular, um estudo do grupo colaborativo Cancer Genome Atlas Research Network (2014) utilizou diversas plataformas em amostras obtidas de pacientes submetidos a cistectomia. A análise por clusters das mutações e das alterações no número de cópias cromossômicas (CNA) identificou três grupos distintos: o primeiro associado a mutações de *MLL2* e alterações somáticas focais de CNA de múltiplos genes; o segundo grupo de tumores, de morfologia predominantemente papilífera, caracterizou-se por perda de *CDKN2A* e alterações em *FGFR3*; e o terceiro grupo, com frequente morfologia escamosa, associou-se a mutações em *TP53* e *RBI* e ampliações de *E2F* e *CCNE*. Curiosamente, no mesmo estudo, a análise por *cluster* dos valores normalizados de expressão proteica, gênica (mRNA) e de miRNAs identificou quatro grupos, semelhantes à análise de mutações/CNA. Um deles, caracterizado por histologia papilífera com hiperexpressão de *FGFR3* e expressão reduzida de seus miRNAs associados (mir-99a e mir-100), também demonstrou hiperexpressão de HER2 (receptor 2 do fator de crescimento

epidérmico humano) e receptor de estrógeno, além de perda da expressão de e-caderina e de mir-200 (relacionado com a transição epitélio-mesenquimal), compondo um perfil molecular comparável ao de carcinomas de mama do tipo luminal. Outro grupo, com frequente morfologia escamosa, demonstrou expressão de citoqueratinas associadas a um fenótipo basal (CK14 e CK5). De certa forma, esses achados apontam que, em uma coorte heterogênea de carcinomas agressivos operados por cistectomia, alguns apresentam fenótipo relacionado à via músculo-invasiva de oncogênese, enquanto outros são mais associados ao fenótipo da via não músculo-invasiva. Estes correspondem possivelmente a carcinomas inicialmente não músculo-invasivos progredidos, quando nem sempre há ciência dos eventos pregressos.

É importante salientar que os carcinomas de fenótipo basal parecem ser mais sensíveis à quimioterapia convencional baseada em cisplatina, enquanto os carcinomas mais bem diferenciados, de fenótipo luminal, são frequentemente quimiorresistentes (CHOI et al. 2014a; MCCONKEY et al. 2015). Embora o carcinoma urotelial mantenha-se com altos índices de letalidade e disponha de poucas opções terapêuticas, o cenário molecular tem sido melhor caracterizado nas últimas duas décadas. Tais avanços oferecem ferramentas moleculares potencialmente capazes de melhorar a acurácia diagnóstica e prognóstica, abrindo perspectivas animadoras para o manejo da doença e experimentação de terapias-alvo.

1.3 A VIA mTOR E A INTERAÇÃO COM OUTRAS VIAS REGULATÓRIAS

As células respondem prontamente aos estímulos e restrições do ambiente, alterando a expressão gênica de forma eficiente e precisa. Proteínas são produzidas como consequência da transcrição de novos mRNAs, porém a tradução de mRNA em proteína é finamente regulada e cujo processo é fundamental na constituição do proteoma. As células usam o controle da tradução para modular a expressão gênica em várias etapas da vida – por exemplo durante a formação embriológica, formação de memória, e manutenção da fisiologia normal – e a desregulação desses mecanismos pode contribuir para várias doenças humanas, inclusive o câncer.

Como parte integral do processo biossintético, a tradução proteica consome uma quantidade substancial de matéria celular e energia. Para crescer e proliferar, é preciso haver uma quantidade suficiente de recursos disponíveis para a produção de proteínas. Quando a energia ou aminoácidos encontram-se em quantidades limitadas, a produção de proteínas precisa ser diminuída, de modo a permitir que tais recursos sejam destinados à sobrevivência da célula. Assim, as células de mamíferos evoluíram no sentido de desenvolver mecanismos de controle de tradução, a maioria deles sensíveis à disponibilidade de nutrientes, energia celular, *stress*, hormônios e fatores de crescimento (MA e BLENIS 2009).

Uma via “chave” que integra a percepção e resposta a esses estímulos envolve o alvo da rapamicina (TOR, *target of rapamycin*), membro da família de quinases relacionadas à fosfatidilinositol 3-quinase (PIKK) e conservado de leveduras a humanos. A via mTOR é iniciada pela fosforilação de receptores tirosina-quinase

(RTKs) a partir de interações com seus ligantes na superfície da célula, capaz de transformar o grupo 3'-hidroxil de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), processo catalisado pela tirosina-quinase fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) (CANTLEY et al. 2002). Uma vez corretamente posicionada na membrana celular através da ligação com PIP3, a quinase serina/treonina AKT pode ser fosforilada pelas quinases ativadoras PDK1 (quinase fosfatidilinositol-dependente 1) no aminoácido treonina, posição 308 (Thr308), e pelo complexo mTORC2 no aminoácido serina, posição 473 (Ser473), este último através de um ciclo em retroalimentação que leva à sua ativação plena (SARBASSOV et al. 2005). PIP3 também se liga a PTEN, que faz o caminho reverso e defosforila PIP3 a PIP2. Assim, PTEN representa um importante regulador negativo da sinalização da via mTOR (CHALHOUB e BAKER 2009).

O complexo mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), que contém TOR em associação com raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) e LST8, regula diretamente a síntese proteica em mamíferos. Um segundo complexo, mTORC2, que contém rictor (*rapamycin-independent companion of mTOR*), LST8 e SIN1 (*stress-activated protein kinase-interactin protein 1*), atua em funções biológicas distintas de mTORC1, principalmente através da fosforilação de AKT. Como os nomes raptor e rictor sugerem, apenas mTORC1 é sensível à inibição pela rapamicina. Assim, além de PTEN, outro ponto de controle é AKT que, uma vez ativado, é capaz de fosforilar efetores que regulam diversos processos essenciais, como síntese proteica, metabolismo celular, proliferação e sobrevivência, bem como resistência a várias injúrias exógenas (HAY 2005; STEELMAN et al. 2008b). Ademais, AKT ativado também inibe a

atividade transcricional de *Foxo3a* (do inglês, *Forkhead box O3*), levando à redução da expressão de vários genes pró-apoptóticos como *Caspase-3* e *TP53*.

A atividade fosfotransferase do complexo mTORC1 é estimulada por RHEB (*Ras homologue enriched in brain*), que é regulado por um heterodímero supressor tumoral composto pelas proteínas hamartina e tuberina, codificadas pelos genes mutados na esclerose tuberosa *TSC1* e *TSC2*, conservados de *Drosophilas* a humanos. Tuberina apresenta atividade tipo GTPase com relação a RHEB, convertendo-o à forma inativa GDP-ligante. Os principais alvos de mTORC1 parecem ser componentes da maquinaria de tradução proteica, incluindo 4E-BP1 (*4E binding protein 1*) e quinases S6 (S6K), ambos de papel fundamental no controle da iniciação da tradução proteica global da célula. Estimulada pelo aumento global da tradução proteica decorrente da ativação de S6K, a ciclina D1 induz a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), que se desliga do fator de transcrição E2F, permitindo a progressão do ciclo celular e estabelecendo um dos principais elos entre este e a via mTOR (GAO et al. 2004).

A regulação da fosforilação de S6 tem atraído muita atenção desde sua descoberta em 1974 por GRESSNER e WOOL, especialmente devido à relação temporal entre a fosforilação de S6 e o início da síntese proteica. Esta observação sugere que o processo de fosforilação facilite a montagem do polissomo, que são ribossomos que estão ativamente traduzindo mRNAs. mTORC1 fosforila S6K, que leva à fosforilação da proteína S6 ribossomal (phosS6) no aminoácido serina, na posição 235/236 (phosS6^{Ser235/236}), resultando no aumento da tradução global de proteína na célula (HORNBERGER et al. 2007). mTORC1 também fosforila 4E-BP1, favorecendo sua dissociação de eIF-4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) e cancelando a inibição da tradução de proteínas “CAP-dependente” (PAUSE et al. 1994). Vale notar

que esta regulação da tradução pelo mTORC1 é altamente sensível à quantidade de nutrientes disponível (ZONCU et al. 2011; PÓPULO et al. 2012).

Entre as várias vias relacionadas à tradução, são conhecidas duas que operam através de mTORC1: PIK3-AKT, descrita acima, e RAS-ERK (*extracelular signal-regulated kinase*) que, inibindo o complexo TSC1-TSC2, constitui-se em um regulador negativo de mTORC1. A inibição de TSC1-TSC2 é mediada principalmente pela fosforilação de TSC2 por várias quinases a montante, incluindo AKT, ERK e RSK (*ribossomal S6 kinase*). Por sua vez, S6K1, é capaz de inibir a ativação de AKT via PI3K, em retroalimentação negativa (HARRINGTON et al. 2004). Uma vez que AKT é um importante regulador da apoptose, este mecanismo de retroalimentação PI3K-AKT-mTORC1-S6K1 pode exercer um papel pró-sobrevivência, em efeito oposto ao papel pró-apoptótico operado pela via mTORC2-AKT. Estudos pré-clínicos indicam que a inibição de culturas celulares com rapamicina pode exercer efeito pró-apoptótico ou pró-sobrevivência, a depender da linhagem celular utilizada (FUMAROLA et al. 2005).

Ademais, AKT em si é capaz de ativar mTORC1 através de dois mecanismos interconectados: inibição de PRAS40 (40 kDa *Pro-rich AKT substrate*) e/ou ativação de RHEB para sua forma ativa, que é capaz de fosforilar mTOR diretamente (INOKI et al. 2003). Uma vez que o complexo TSC1-TSC2 não é encontrado em alguns eucariotos primitivos (por exemplo leveduras esporulantes), é possível que o módulo TSC-independente de ativação de mTORC1 por AKT seja mais antigo e conservado, enquanto o módulo TSC-RHEB tenha evoluído mais tarde em eucariotos, a fim de refinar a atividade mTORC1 em resposta a sinalizações ambientais mais complexas. De fato, mudanças da quantidade relativa de PRAS40 ou RHEB-GTP podem afetar a atividade de mTORC1, tanto *in vitro* como *in vivo* (VANDER HAAR et al. 2007;

SANCAK et al. 2007), sugerindo que variações tecido-específicas da abundância dessas proteínas orientem diferentes níveis de atividade de mTORC1.

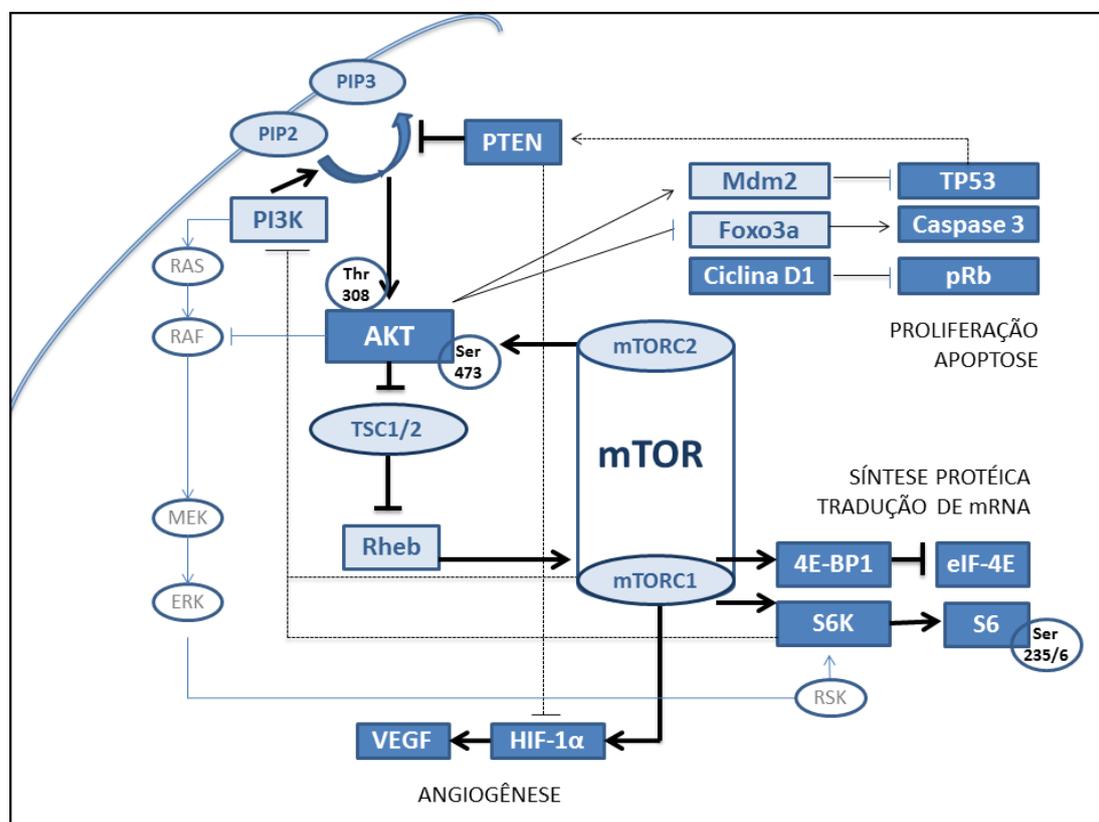


Figura 2 – Figura esquemática da via mTOR e suas principais interações. Em cores escuras, as proteínas/genes estudados neste trabalho. Setas pontilhadas mostram mecanismos de controle em retroalimentação. Setas em azul mostram a sinalização da via MAPK. A via mTOR é iniciada pela ativação de *PI3K*, que fosforila PIP2 a PIP3, cuja interação leva ao recrutamento de AKT para a membrana celular, onde pode ser fosforilada e ativada. PIP3 também se liga ao PTEN, que de-fosforila PIP3 a PIP2, representando um importante regulador negativo da via. AKT ativado bloqueia a interação TSC1-TSC2, que por sua vez converte RHEB em sua forma ativa, fosforilando mTOR diretamente. AKT também regula o ciclo celular através da interação com caspase-3 e TP53. mTOR é parte de dois complexos, mTORC1 e mTORC2. mTORC1 fosforila S6K, que leva à fosforilação de pS6 e 4E-BP1, promovendo a tradução de proteínas. mTORC1, assim, regula a tradução de vários fatores de transcrição, como HIF-1 α e VEGF. Notavelmente, o mTORC1 é capaz de ativar PI3K em retroalimentação negativa. A via MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) também interage com a via mTOR, podendo fosforilar S6 diretamente, através de RSK.

A regulação tecido-específica da síntese proteica é uma área de enfoque para futuros estudos. A sinalização de mTORC1 em uma célula quiescente terminalmente diferenciada, como um neurônio, por exemplo, provavelmente difere daquela em uma célula cancerígena desdiferenciada e altamente proliferativa, uma vez que a regulação temporal e espacial da tradução proteica pode variar significativamente, ainda que nas mesmas condições ambientais. A via mTOR também participa da diferenciação celular tecido-específica, porém esses mecanismos são menos esclarecidos que seu papel na tradução de proteínas. De fato, esta via atua na diferenciação ectodérmica desde a fase de blastocisto, em um processo dependente da biodisponibilidade de aminoácidos (MARTIN e SUTHERLAND 2001). A participação de mTOR durante o desenvolvimento embriológico enfatiza seu papel dinâmico, revelando funções adicionais além do crescimento celular. A sinalização embrionária de mTOR tem efeitos tecido-específicos e temporais-específicos, envolvidos em várias etapas da organogênese, diferenciação sexual e transição epitélio-mesenquimal (HWANG et al. 2008). Através do seu efeito promotor de tradução de mRNA, a via também é capaz de promover diferenciação osteogênica, miogênica e adipocítica (XIANG et al. 2011).

mTORC1 também atua indiretamente na angiogênese, ao regular a tradução do fator 1α de transcrição induzido por hipóxia (HIF- 1α) e a expressão de genes-alvo que codificam fatores angiogênicos essenciais, como o fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF) (MANNING e CANTLEY 2003). A hipóxia pode interferir no comportamento de células tumorais através de inúmeras vias oxigênio-sensíveis, dentre as quais a mais compreendida é a via induzida por hipóxia, mediada pelos fatores de transcrição induzidos por hipóxia (HIFs) e cuja síntese é dependente da ativação das vias mTOR e MAPK. Analogamente, o acúmulo de HIF- 1α é um estimulador da via

mTOR, inclusive de maneira independente de um microambiente hipóxico (LIU et al. 2006; WOUTERS e KORITZINSKY 2008).

Mais recentemente, foram reconhecidas outras duas vias O₂-sensíveis capazes de influenciar a expressão gênica de maneira independente: a via de maturação da resposta proteica (UPR, do inglês *unfolded protein response*) e a via mTOR. Supõe-se que a via induzida por hipóxia seja responsável por suprimir a tradução de mRNA e síntese proteica em ambientes de baixa oxigenação, através da inibição da via mTOR e outros mecanismos (TICKOO et al. 2010). A regulação dos componentes dessas vias pela hipóxia é complexa, acompanhando-se de uma resposta celular inter e intra-tumoral bastante heterogênea.

1.4 ALTERAÇÕES DA VIA mTOR NO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

A via mTOR está alterada em 40% a 72% dos carcinomas uroteliais clássicos ou suas variantes (Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Essas alterações correspondem a mutações em vários genes que regulam a via, incluindo proto-oncogenes como *PI3K* e *AKT* e genes supressores de tumor, como *PTEN*. A perda da expressão de *PTEN* tem sido relatada em cerca de metade dos carcinomas uroteliais de comportamento invasivo (AVEYARD et al. 1999; WU et al. 2004) e as mutações somáticas em torno de 23% (WANG et al. 2000; PANTUCK et al. 2007). A ativação do eixo AKT/mTOR relacionada à perda de expressão de *PTEN* é proposta em tumores de outros órgãos genitourinários além da próstata e bexiga, como no rim e no carcinoma urotelial do trato superior (CHEN et al. 2009; QIAN et al. 2009). A perda de *RBI* e

PTEN está associada à progressão de carcinoma urotelial *in situ* para carcinoma invasivo, com redução da sobrevida global (CASTILLO-MARTIN et al. 2010). Juntamente com variações no número de cópias cromossômicas, uma série de rearranjos gênicos e mutações pontuais ativadoras vêm sendo identificadas em genes sabidamente associados à progressão tumoral, como *TP53* e *FGFR3*, *RBI*, *BRAF* ou *HRAS* (LINDGREN et al. 2012; WILLIAMS et al. 2013).

Através de sequenciamento de nova geração e de tecnologias integrativas, foi traçado um cenário genômico mais amplo dos tumores uroteliais, validado por grupos independentes em coortes variadas (MHAWECH-FAUCEGLIA et al. 2006; IYER et al. 2012; LINDGREN et al. 2012, GUO et al. 2013; Cancer Genome Atlas Research Network 2014). Esses estudos também confirmaram o alto índice de alterações em genes-chave envolvidos na via mTOR, reforçando o seu status de via “alvo” no câncer de bexiga.

Em um estudo prévio, a candidata e colaboradores (SCHULTZ et al. 2010) demonstraram que a imunexpressão de *PTEN*, *phosAkt*, *phosS6* e *phos4E-BP1* é menor em tumores do que no urotélio não neoplásico da periferia do tumor, utilizando uma coorte de 123 pacientes, composta por 80% de carcinomas músculo-invasivos tratados por cistectomia. A expressão positiva de *phosS6* mostrou-se um fator preditivo independente de sobrevida doença específica. Esta observação pode ser considerada paradoxal do ponto de vista biológico, visto que os pacientes cujos tumores têm aparente ativação da via mTOR, supostamente mais propícios ao crescimento e proliferação celular, apresentaram uma melhor sobrevida. Por outro lado, a observação de menores níveis de expressão de componentes da via mTOR em tumores, especialmente nos mais agressivos, permite considerar que a redução dos seus efeitos

possa causar algum tipo de vantagem pró-sobrevivência na célula maligna. Assim, apesar de comprovar que a via mTOR está alterada em carcinomas uroteliais e que essas alterações têm impacto prognóstico, os achados do estudo sugerem que a via mTOR possa estar sob interferências inibitórias nesses tumores, possivelmente oriundas de suas interações com outras vias essenciais ou regulações pós-transcricionais, como microRNAs (miRNAs) silenciadores. Essas observações são muito relevantes no contexto terapêutico: se a ativação da via mTOR comporta-se como um fator protetor de sobrevida, haveria benefício na sua inibição farmacológica?

Posteriormente, SUN et al. (2011) demonstraram valor prognóstico negativo da expressão de phosS6 em 627 carcinomas não músculo-invasivos tratados por ressecção transuretral, enquanto nos 92 carcinomas músculo-invasivos da coorte, tratados por cistectomia, não houve impacto prognóstico. No ano seguinte, KORKOLOPOULOU et al. (2012) demonstraram expressão reduzida de phos-p70S6K (precursor de phosS6) e phos4E-BP1 em tumores, em relação ao urotélio benigno controle, em uma coorte constituída por 70% de lesões não músculo-invasivas. Por outro lado, a expressão de outros membros da via mTOR, como phosAKT e phos-mTOR mostraram níveis mais elevados nas amostras tumorais. Neste estudo, a expressão de 4E-BP1, mas não de S6, foi um fator preditor independente de sobrevida doença específica.

Assim, os resultados concordam que a via mTOR está alterada no carcinoma urotelial e que a expressão de membros desta via têm valor prognóstico em relação à sobrevida. O nível de expressão de membros desta via parece variar, entretanto, entre amostras benignas e malignas, e entre carcinomas não músculo-invasivos e músculo-invasivos, de acordo com a composição das coortes de estudo.

1.5 miRNAS NO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

Os miRNAs representam uma classe de pequenos RNAs não codificantes que regulam a expressão gênica. Essas moléculas possuem cerca de 22 nucleotídeos e exercem seus efeitos inibitórios ligando-se principalmente à região 3' UTR não traduzida de RNAs mensageiros específicos (RNAs alvo). O RNA mensageiro ligado ao miRNA não é traduzido, levando a baixos níveis de proteína, ou pode ser degradado, resultando em redução de seu nível (ZHANG et al. 2007). Os miRNAs estão implicados em diversos processos biológicos, como proliferação, apoptose e diferenciação, o que os torna moléculas importantes também no desenvolvimento de tumores. Uma redução na transcrição de alguns miRNAs pode estimular a transformação oncogênica, enquanto o aumento da transcrição de outros miRNAs pode inativar genes supressores de tumor.

Nos últimos anos, houve um acréscimo exponencial no conhecimento da participação dos miRNAs no desenvolvimento dos tumores de bexiga (VEERLA et al. 2009; SONG et al. 2010; FENDLER et al. 2011; PIGNOT et al. 2012). Em linha com o que tem sido proposto para a oncogênese urotelial, os resultados apontam para uma diferença no perfil de expressão entre tumores não músculo-invasivos e músculo-invasivos. CATTO et al. (2009) também identificaram diferenças relacionadas à graduação do carcinoma urotelial, mostrando que tumores de alto grau tendem a um perfil de hiper-regulação e os de baixo grau à hiporregulação. O mir-129, por exemplo, apresenta valor prognóstico em tumores pTa e pT1, mostrando propriedades inibidoras da via de FGFR3, cujos genes alvo candidatos são *EGFR*, *Kras* e *RPS6*, moduladores da via mTOR (DYRSKJØT et al. 2009). Um estudo por DIP et al. (2012), que excluiu tumores pT1, mostrou hipoexpressão de mir-100 e hiperexpressão de mir-10a em

carcinomas pTa, enquanto carcinomas músculo-invasivos apresentaram hiperexpressão de mir-21 e mir-205. Nesta mesma coorte, a hiperexpressão de mir-21 e mir-10a impactou negativamente na sobrevida doença específica em tumores pTa e músculo-invasivos, respectivamente. De fato, mir-10 parece inibir os genes *MDM2* e *MDM4*, ligados à via do *TP53*, sabidamente alterada em tumores músculo-invasivos (VEERLA et al. 2009).

Certos miRNAs têm sido associados com fenômenos clássicos ou vias canônicas de oncogênese urotelial, tendo sido estudados mais detalhadamente. A família dos mir-200 associa-se à transição epitélio-mesênquima (ADAM et al. 2009), enquanto o mir-100 mostrou ação anti-oncogênica em bexiga, inibindo a via mTOR diretamente em ensaios in vitro e in vivo (XU et al. 2013; MORAIS et al. 2014). O mir-200a também tem sido explorado quanto ao potencial diagnóstico. YUN et al. (2012) mostraram que pacientes com baixos níveis urinários de mir-200a apresentaram maior risco de recorrência. No mesmo estudo, a expressão de mir-145 foi capaz de distinguir o grupo de pacientes com carcinoma de bexiga em relação aos controles, com sensibilidade e especificidade em torno de 80% e 60%, respectivamente.

Algumas linhas de pesquisa já investigam miRNAs possivelmente associados com resposta quimioterápica, em especial à cisplatina (NORDENTOFT et al. 2012), enquanto outros procuram aplicação terapêutica de moléculas sintéticas, isoladas ou combinadas (LIU et al. 2012).

1.6 O TRATAMENTO DO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

Lesões não músculo-invasivas são passíveis de ressecção transuretral (RTU). Embora relativamente pouco agressiva, a cistoscopia requer infra-estrutura de cirurgia eletiva, além do aparato tecnológico, o que a torna dispendiosa e imperfeita para aplicação em larga escala. Pacientes com parâmetros prognósticos desfavoráveis são candidatos a terapia intravesical pós-RTU (com quimioterápicos ou BCG), devido ao alto risco de recorrência. Em caso de falha terapêutica, pode ser indicada a cistectomia mesmo em estádios anteriores à invasão muscular (HERR e DALBAGNI 2003). Embora a doença músculo-invasiva (fruto de progressão ou *de novo*) seja a principal indicação da cirurgia radical, outras situações clínicas também amparam a indicação deste procedimento em doença não músculo-invasiva de alto risco, como múltiplas recorrências, lesão em localização de difícil ressecção ou estadiamento e presença de extensão à próstata (ductos ou estroma) (MARTIN e KAMAT 2009).

O tratamento cirúrgico definitivo consiste na remoção da bexiga, chamada cistectomia radical em mulheres ou cistoprostatectomia radical em homens, onde a próstata é removida por estratégia cirúrgica. O procedimento envolve a construção de um novo reservatório de urina, a partir de um segmento intestinal, denominado neobexiga, ou através de um canal de derivação, sendo a incontinência urinária inevitável. Apesar desses investimentos, que associam o carcinoma urotelial ao maior custo de tratamento por estágio patológico entre os tumores sólidos (JEMAL et al. 2007), a sobrevida doença específica após uma cistectomia é de 50% em 5 anos (STEIN et al. 2001).

Os carcinomas uroteliais de bexiga são relativamente sensíveis a quimioterapia, com respostas objetivas de até 50%. Entretanto, esses tumores não são curados e a recidiva é observada invariavelmente após o tratamento com agentes de primeira linha. Para tumores localmente avançados ou metastáticos, o melhor esquema continua se baseando na cisplatina, com mediana de sobrevida de 14 a 15 meses (VON DER MAASE et al. 2005; BAMIAS et al. 2006). Se houver contra-indicação, vários esquemas baseados em carboplatina vêm sendo testados, com resultados semelhantes (SIO et al. 2014). Outras quimioterapias com agentes isolados ou combinados com gemcitabina foram alvos de estudos clínicos recentes de fase II (LIN et al. 2008; KIM et al. 2012; SIO et al. 2014), porém, apesar de alguns resultados encorajadores, não houve incremento da sobrevida global dos pacientes.

Em ensaios pré-clínicos, inibidores do mTOR como a rapamicina têm demonstrado *performance* satisfatória em modelos experimentais de carcinogênese e de cultura de células (MANSURE et al. 2009; PARADA et al. 2011; MAKHLIN et al. 2011), bem como cooperação com a cisplatina em carcinomas uroteliais (LEI et al. 2009) e outros tumores sólidos, incluindo carcinoma endometrial do útero e epidermóide de laringe (BAE-JUMP et al. 2009; SEAGER et al. 2009). Em experimentos *in vivo* com modelos animais de carcinoma urotelial progressor, a terapia intravesical com rapamicina foi capaz de prevenir a progressão do carcinoma *in situ* para invasor (MCCONKEY et al. 2009). Em culturas celulares, o tratamento com sunitinib, um inibidor do VEGF, potencializa a citotoxicidade proporcionada pelo BCG e pela cisplatina (SONPAVDE et al. 2009; PING et al. 2012). Essa droga, entretanto, não alcançou critérios aprobatórios como monoterapia, em um estudo de fase II (GALLAGHER et al. 2010). A combinação terapêutica de anti-VEGF e inibidores de

mTOR tem demonstrado ser uma linha promissora. O everolimus e o temsirolimus já foram aprovados pelo FDA para uso conjunto em outras neoplasias, como o carcinoma de células claras ovariano e renal (MIYAZAWA et al. 2009; FLAHERTY et al. 2010), sendo a primeira linha para carcinomas de células claras metastático, uma vez que há maior ativação das vias nas metástases do que nos tumores primários correspondentes (SCHULTZ et al. 2011).

Ensaio clínico (Figura 3) com inibidores de mTOR (everolimus) e de VEGF (bevacizumab ou sunitinib) não foram superiores ao tratamento de segunda linha. Entretanto, no caso do everolimus, uma publicação recente mostrou que pacientes com mutações somáticas de perda de função (deleções) do gene *TSC1* e *NF2* apresentaram sobrevida significativamente maior (IYER et al. 2012), enfatizando a importância do contexto genético do tumor para resposta ao quimioterápico.

A expressão reduzida ou perda da expressão de PTEN representa a alteração mais frequentemente encontrada no carcinoma urotelial de bexiga. A deficiência de PTEN é associada com a ativação da via mTOR, em cujo racional baseia-se a possibilidade de tumores PTEN-negativos mostrarem melhor resposta aos inibidores de mTOR (NESHAT et al. 2001; PODSYPANINA et al. 2001; STEELMAN et al. 2008a). Apesar disso, um estudo de fase II investigando a *performance* de everolimus em pacientes com carcinoma urotelial localmente avançado ou metastático mostrou uma correlação inesperada entre a perda de PTEN e quimiorresistência (SERONT et al. 2012). De fato, a perda de PTEN foi acompanhada de ativação de AKT em resposta à inibição de mTOR.

Clinical trials with inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancers. For published trials, results show median progression free survival (PFS) and overall survival (OS) in months.

Drugs	Phase	Indication	Nb patients	Results/status	Reference ^a
Everolimus	II	Post-cisplatin	45	PFS: 2.6 months OS: 8.3 months	Milowsky et al., 2013
Everolimus	II	Post-cisplatin	37	PFS: 2 months OS: 3.4 months	Seront et al., 2012
Temsirolimus	II	Second line	15	PFS: 2.5 months OS: 3.5 months	Gerullis et al., 2012
Siroliimus	0	Neoadjuvant bladder cancer		Recruiting	NCT01827618
Siroliimus + cisplatin + gemcitabine	I/II	First line advanced bladder cancer		Recruiting	NCT01938573
Temsirolimus + cisplatin + gemcitabine	I/II	First line metastatic bladder cancer	99	Completed	NCT01090466
Temsirolimus	II	Second line metastatic bladder cancer		Recruiting	NCT01827943
Everolimus	II	Post-cisplatin	40	Completed	NCT00714025
Everolimus	II	Second line metastatic bladder cancer		Active not recruiting	NCT00805129
Everolimus + gemcitabine + cisplatin (Split dose)	I	Advanced solid tumors (bladder, kidney, ureter)		Recruiting	NCT01182168
Everolimus + paclitaxel	II	First line for unfit patients for cisplatin		Recruiting	NCT01215136
Everolimus + paclitaxel	II	Second line metastatic bladder cancer		Terminated	NCT00933374
BKM120 (buparlisib)	II	Second line metastatic bladder cancer		Recruiting	NCT01551030
Celecoxib	II/III	Recurrent bladder cancer	152	Completed	NCT00066124
GSK2126458	I	Advanced solid tumors	170	Closed	Munster et al., 2012

^a The status of ongoing trials refers to the NCT number indicated on the National Institutes of Health ClinicalTrial.gov website.

Fonte: HOUÉDÉ e POURQUIER (2014).

Figura 3 -. Ensaios clínicos com inibidores da via mTOR, com suas respectivas indicações e resultados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a via mTOR e suas principais interações no carcinoma urotelial de bexiga, analisando sua relação potencial com a heterogeneidade clínico-patológica de uma coorte submetida a cistectomia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Caracterizar a expressão gênica e a expressão proteica da via mTOR, via induzida por hipóxia e ciclo celular, em amostras de carcinoma urotelial e de urotélio não neoplásico.
- 2 Investigar o perfil de expressão de miRNAs de acordo a expressão do efetor da via mTOR (phosS6), em correlação com dados clínico-patológicos.
- 3 Validar o valor prognóstico da expressão de phosS6 em carcinomas uroteliais, de forma independente dos fatores clinico-patológicos classicamente associados à sobrevida doença específica.

3 DESENHO EXPERIMENTAL

3.1 PACIENTES

3.1.1 Elaboração da coorte de estudo

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente. A partir dos registros do Biobanco, foram identificados todos os pacientes com reserva de tecido vesical “a fresco” congelado. (CAMPOS et al. 2012; OLIVIERI et al. 2014) Lâminas e blocos de parafina correspondentes ao espécime cirúrgico foram recuperados do arquivo. Produtos de ressecções por RTU foram excluídos da análise, sendo que a coorte final correspondeu a pacientes submetidos a cistectomia no Hospital A.C. Camargo entre 2000 e 2010.

Critérios de Inclusão na coorte:

- pacientes submetidos a cistectomia ou cistoprostatectomia.
- possuir tecido tumoral congelado armazenado no Biobanco do Hospital A.C Camargo;
- possuir material tumoral correspondente preservado em parafina;

Citérios de Exclusão da coorte:

- ressecções por RTU (ressecção transuretral);
- carcinoma urotelial metastático ou com sítio primário em trato urinário superior;
- indisponibilidade do bloco de parafina ou material insuficiente para análise.
- seguimento clínico inferior a dois anos.

Após o levantamento inicial de 134 pacientes, foram subtraídos 33 pacientes devido a ressecções por RTU (15), tumores não uroteliais ou não primários (3), ausência de representatividade tumoral em blocos de parafina (1) ou indisponibilidade de blocos

de parafina (11), e 3 pacientes que não somariam dois anos de seguimento até a conclusão estimada da etapa de obtenção de dados (Figura 4). Ao final, foram incluídos 101 pacientes na coorte de estudos. Destes, 2 pacientes apresentaram tumores muito diminutos nos blocos de parafina recuperados, e outros 16 pacientes não tiveram suas amostras extraídas congeladas, devido à insuficiência de tecido de interesse armazenado no Biobanco.

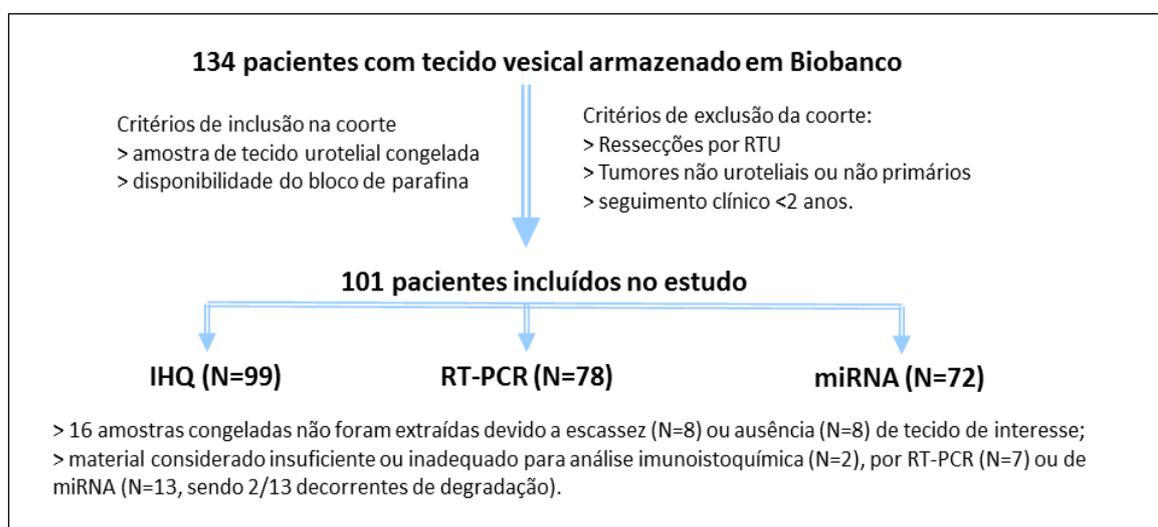


Figura 4 – Etapas de elaboração da coorte de estudo de 101 pacientes, considerando critérios de inclusão e exclusão, mostrando os números finais de amostras avaliadas por cada tipo de plataforma utilizada.

3.1.2 Processamento e anotação anatomopatológica

Todos os pacientes foram submetidos a cistectomia radical por carcinoma urotelial de bexiga com linfadenectomia pélvica (simples ou estendida), entre janeiro de 2000 a outubro de 2010. As peças foram processadas macroscopicamente em sistema de *checklist* e laudadas de acordo com as edições correntes (5^a a 7^a) dos protocolos da *American Joint Comitee on Cancer- AJCC/ TNM* (EDGE et al. 2010). Os tumores foram dimensionados pelo maior eixo macroscópico. A configuração macroscópica foi

anotada de acordo com o laudo anatomopatológico como papilífero e não-papilífero, sendo a ulceração macroscópica acessada independentemente da configuração do tumor.

As lâminas foram revisadas por um uropatologista e as divergências entre o laudo inicial (primeiro patologista) e o patologista revisor foram trazidos a consenso com um terceiro patologista. Parâmetros histológicos como presença de variante histológica agressiva do carcinoma urotelial, diferenciação urotelial adversa (glandular ou escamosa), morfologia microscópica papilífera, morfologia microscópica não-papilífera e ulceração microscópica, foram consideradas quando correspondentes a pelo menos 10% do tumor amostrado. O estadiamento patológico (EDGE et al. 2010) foi categorizado em “não músculo-invasivo” (NMI) quando pTis, pTa ou pT1, “músculo-invasivo, confinado ao órgão” (MI-OC) quando pT2, e “músculo-invasivo, não confinado ao órgão” (MI-NOC) quando pT3 ou pT4.

3.1.3 Obtenção dos Dados Clínicos

O banco de dados foi levantado por um urologista a partir dos prontuários médicos (SAME) e atualizadas a cada consulta de atendimento ambulatorial no Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica (última atualização em 20/04/2014). Este processo incluiu informações demográficas, antecedentes mórbidos, tipo de tratamento, terapias e diagnósticos prévios, achados dos exames endoscópicos, dados de recorrência e progressão da doença, complicações do tratamento e situação clínica na data final do último seguimento de cada paciente (*follow-up*). Os parâmetros coletados seguem a padronização (“ficha”) elaborada pela equipe médica de Urologia do AC Camargo Cancer Center.

O seguimento dos pacientes baseou-se na data do último registro no prontuário eletrônico. Nos casos que excederam 12 meses sem atualizações, os pacientes/familiares foram contatados por telefone para verificação do *status* de sobrevida: vivo sem doença, vivo com doença, óbito relacionado ao carcinoma urotelial, óbito relacionado ao tratamento (toxicidade da adjuvância, complicações cirúrgicas imediatas ou tardias) e óbitos não relacionados (segunda malignidade primária, fratura benigna do fêmur e outros traumas, eventos isquêmicos e outras complicações). A sobrevida foi analisada como sobrevida doença específica (vivos vs. óbitos relacionados, considerando óbitos não relacionados e óbitos pelo tratamento como dados censurados).

3.1.4 Caracterização Clínica da coorte

A Tabela 1 resume os dados clínicos da coorte que se mostraram mais relevantes durante a análise dos resultados. A idade média (na data da cistectomia) foi de 66,8 anos (35-87). A média de comorbidades foi de 1,4 por paciente, sendo a hipertensão a mais prevalente (n=39/101; 39%). Em avaliação pré-operatória, os pacientes foram classificados pelo escore de *American Society of Anesthesiology* (ASA) (SAKLAD et al. 1941), com a seguinte distribuição: escore ASA II (doença sistêmica leve): 69 (67%) pacientes; ASA III (doença sistêmica severa) 31 (30%) pacientes e ASA I (saúde normal): 3 (3%) pacientes. O tabagismo, importante fator de risco para o desenvolvimento das neoplasias uroteliais, foi observado em 72/98 pacientes com informação disponível, sendo metade deles tabagistas ativos no momento da cirurgia e os demais ex-tabagistas, com tempo médio de cessação do hábito de fumar de 18 anos. O número de cigarros consumidos não esteve relacionado ao tempo de tabagismo

($p=0,234$), sendo as médias desses parâmetros semelhantes entre fumantes (17.5 cigarros/dia durante 29.3 anos) e ex-fumantes (16.5 cigarros/dia, durante 26.9 anos).

Tabela 1 - Distribuição categórica dos parâmetros clínicos e evolutivos da coorte de 101 pacientes tratados por cistectomia.

		N	%
Idade (anos)	30 a 59	25	25%
	60 a 69	34	33%
	70 a 79	33	32%
	80 a 90	10	10%
Sexo	Masculino	65	63%
	Feminino	38	37%
Uso de tabaco	Não fumante	29	29%
	Ex-fumante	38	38%
	Fumante	34	34%
ASA	I	3	3%
	II	69	67%
	III	31	30%
Progressão	Sem redivida	56	61%
	Com recidiva	36	39%
Sobrevida doença específica	Vivos até o seguimento	35	35%
	Óbito não relacionado à doença	25	25%
	Óbito relacionado à doença	41	40%

ASA: *Classificação de status físico da American Society of Anesthesiology*;

Conforme mostra a Tabela 2, receberam tratamento prévio com onco-BCG (bacilo Calmette-Guérin) 20/101 (20%) pacientes da coorte. Destes, 6 apresentaram falha do tratamento (HERR e DALBAGNI 2003), sendo 5 acompanhados de progressão para doença músculo-invasiva. Neoadjuvância com quimioterapia foi registrada em 10 casos, um deles sem doença residual no produto de cistectomia, considerado “respondedor”. Vale notar que a seleção inicial de pacientes usou “ausência de tumor macroscopicamente visível” como critério de exclusão, o que pode impactar no baixo índice de resposta.

A maior parte dos pacientes (64/101) apresentou tumores já invasivos na camada muscular própria ($\geq pT2$). A principal indicação para cistectomia foi a doença músculo-

invasiva, já ao diagnóstico ou fruto de progressão/falha de onco-BCG. Doze/101 cirurgias, contudo, foram indicadas em pacientes com doença não músculo-invasiva extensa ou recorrente. Destas, 6 mostraram estadiamento patológico mais avançado após a análise do produto de cistectomia (sub-estadiamento). Outros 51 casos clinicamente estadiados como pT2 mostraram doença não órgão-confinada no produto de cistectomia. O índice final de sub-estadiamento foi de 56,4%.

O tempo de cirurgia foi anotado devido à possibilidade de acentuação da hipoxemia tumoral. A média foi de 401 min, tendo havido necessidade de transfusão de hemoderivados em 81/98 casos com informação disponível. Análises posteriores não apontaram diferenças de expressão gênica ou proteica quanto a este parâmetro.

Tabela 2 - Distribuição categórica dos parâmetros relacionados a diagnósticos e terapias prévios à cirurgia, na coorte de 101 pacientes tratados por cistectomia.

Situação ao diagnóstico	Tumor não músculo-invasivo	37	37%		
	Tumor músculo-invasivo	64	63%		
Local do diagnóstico	AC Camargo	58	57%		
	Outras instituições	43	43%		
Tratamento prévio à cirurgia	BCG [falha]	20 [6]	20% [30%]		
	Neoadjuvância [respondedor]	10 [1]	10% [10%]		
Indicação cirúrgica	Progressão/ Falha de BCG	27	27%		
	Doença NMI extensa	12	12%		
	Múltiplas recorrências	5	5%		
	Carcinoma músculo-invasivo	57	56%		
	cT	pT (cistectomia)	Situação de cT após Cx		
			<T	=T	>T
Ta BG	01 (01)	01 (01)	0	1	0
Ta AG/ Tis	04 (04)	08 (08)	0	2	2
T1	07 (07)	10 (10)	0	3	4
T2	82 (81)	23 (23)	12	19	51
T3	07 (07)	41 (40)	0	7	0
T4	00 (00)	18 (18)	.	.	.

BCG: terapia intravesical com Bacilo Calmette-Guerin; NMI: não músculo-invasiva; cT: estadiamento clínico (pré-cistectomia); pT: estadiamento patológico na cistectomia; Cx: cistectomia; <T: diferença a menos entre cT e pT (subestadiamento); =T: manutenção do estadiamento cT e pT; >T: diferença a mais entre cT e pT (superestadiamento).

3.1.5 Caracterização anatomopatológica da coorte

Foram recuperados do arquivo lâminas e blocos de parafina contendo material neoplásico dos pacientes incluídos na coorte (vide Materiais e Métodos, seção 3.2.1). Todos os tumores, até os não músculo-invasivos, eram carcinomas de alto grau. A revisão histológica classificou 15/101 (14.7%) tumores como variantes do carcinoma urotelial (8 micropapilíferos, 4 sarcomatóides 1 neuroendócrino 1 plasmocitóide e 1 contendo células tipo sinciciotrofoblasto). Ademais 25/101 (24.5%) tumores apresentavam diferenciação adversa (glandular ou escamosa).

A Tabela 3 resume os dados anatomopatológicos da coorte que se mostraram mais relevantes durante a análise dos resultados. Conforme esperado para uma coorte de pacientes operados por cistectomia, os tumores mostraram-se em sua maioria agressivos, 58% dos mesmos com doença extravesical (pT3/pT4). Entre os 19 tumores não músculo-invasivos, 10 mostraram evidências de invasão da lâmina própria (pT1) e cerca de metade invasão vascular e perineural. Contudo, 51% dos tumores foram descritos como papilíferos à macroscopia e, histologicamente, 47% foram classificados como papilíferos ou mistos, permitindo considerar que uma parcela substancial dos carcinomas músculo-invasivos sejam carcinomas “superficiais” progredidos, ainda que o antecedente de tumor não músculo-invasivo tenha sido relatado em apenas 37% dos casos (Tabela 2). Em concordância com essa sugestão 19% das lesões eram multifocais e apenas 37% apresentaram carcinoma *in situ* na mucosa adjacente. As margens cirúrgicas foram asseguradas na grande maioria dos casos, sendo que dos 20% de cirurgias com margens coincidentes com neoplasia, metade correspondeu a comprometimento por carcinoma *in situ* em margens tubulares (ureteres ou uretra).

Tabela 3 - Distribuição categórica dos parâmetros anatomopatológicos da coorte de 101 pacientes tratados por cistectomia.

Categoria	Variáveis	N	%
Estadiamento categorizado	NMI	19	19%
	MI-OC	23	23%
	MI-NOC	59	58%
Estadiamento patológico (pT)	pTa	6	6%
	pTis	3	3%
	pT1	10	10%
	pT2	23	23%
	pT3	41	41%
	pT4	18	18%
Morfologia macroscópica	Papilífero	50	51%
	Não papilífero	48	49%
Histologia	Urotelial clássico	62	61%
	Diferenciação adversa	25	25%
	Variante histológica	15	15%
Ulceração microscópica	Não	38	38%
	Sim	63	62%
Morfologia microscópica	Papilífero	24	24%
	Misto	23	23%
	Não Papilífero	55	54%
Multifocalidade	Não	82	81%
	Sim	19	19%
Carcinoma <i>in situ</i> na mucosa adjacente	Não	64	63%
	Sim	37	37%
Invasão vascular	Não	52	51%
	Sim	49	49%
Invasão perineural	Não	52	51%
	Sim	49	49%
Margem cirúrgica	Não	81	80%
	Margem tubular (CIS)	10	10%
	Margem adiposa (Invasivo)	10	10%
Estadiamento nodal (pN)	pN0	66	65%
	pN1	13	13%
	pN2	12	12%
	pN3	11	11%

NMI: não músculo-invasivo; MI-OC: músculo-invasivo órgão confinado; MI-NOC: músculo-invasivo não órgão confinado; pT e pN: estadiamento patológico de extensão tumoral e nodal baseado na classificação TNM/AJCC.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Construção das lâminas histológicas de *tissue microarray* (TMA) em carcinomas invasivos e de recortes integrais em carcinomas não músculo-invasivos

Dos casos classificados como invasivos na cistectomia (n=82), foram selecionadas as áreas de tumor viável e de urotélio benigno a partir de lâminas coradas com H&E. A partir da correspondência com o bloco original, as áreas de tumor viável foram selecionadas e extraídas do bloco doador por um *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) em cilindros de 1,0mm de diâmetro, e então introduzidos em um bloco receptor. A partir deles, foram preparados 100 cortes histológicos seriados em lâminas de vidro através de microtomia mecânica, na espessura de 4 µm, previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics Inc, USA). Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por HE nos níveis 1, 25, 50, 75 e 100.

Os 82 casos foram representados em quadruplicatas do tecido tumoral e duplicatas de tecido benigno correspondente (pareados), distribuídos em dois blocos de TMA (Figura 5a). Estes blocos incluíram, além das amostras de interesse, tecidos variados malignos e benignos de outros órgãos, que: a) operaram como controles externos positivos e negativos para cada marcador incluído no estudo; e b) orientaram a condução dos *spots* durante a leitura das lâminas.

Nos casos estadiados como não músculo-invasivos na cistectomia (n=19), foram obtidos recortes integrais das lesões e, quando possível, incluiu-se urotélio benigno do mesmo paciente para controle das reações (Figura 5b).

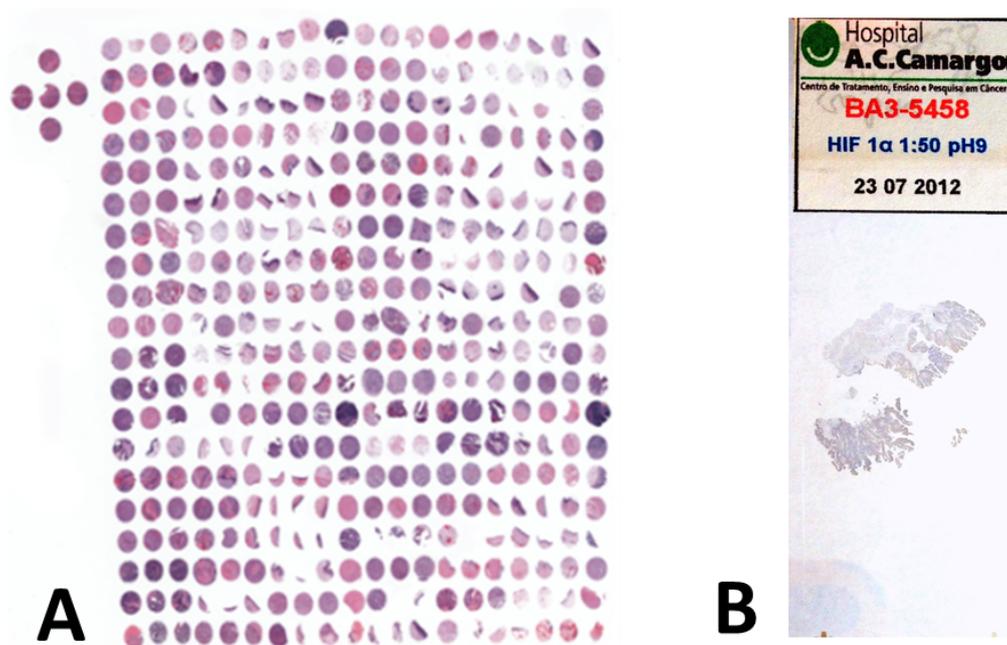


Figura 5 - Scanner das lâminas histológicas de TMA e recortes integrais. (A) Carcinomas músculo-invasivos ($\geq pT2$) foram incluídos no TMA de 1,0 mm/*spot* em quadruplicata, acompanhados de duplicatas de urotélio periférico histologicamente benigno do mesmo paciente, cujos *spots* são vistos como “meia-luas”. (B) Carcinomas não músculo-invasivos (pTis/pTa/pT1) foram mantidos em recortes integrais, por vezes acompanhados de urotélio periférico histologicamente benigno no mesmo fragmento (controle pareado).

3.2.2 Imunoistoquímica

3.2.2.1 Reações imunoistoquímicas

Os anticorpos foram adquiridos de fontes comerciais, tendo os clones sido selecionados a partir da biografia deste projeto, com atenção aos sítios de fosforilação específicos. Os mesmos foram padronizados individualmente, de acordo com as melhores técnicas de diluição, recuperação antigênica e revelação (Quadro 2).

Quadro 2 - Anticorpos primários (imunistoquímica) utilizados para acessar a expressão proteica, com as respectivas referências e dados de padronização.

	Fonte	Clone	recuperação/ diluição	incubação	revelação	sistema
PTEN	Cascade	6H2.1	1:1000 pH 9	overnight	Novolink	manual
phosAKT(Ser473)	Cell Signaling	587F11	1:800 pH 6	overnight	Novolink	manual
phosS6 (Ser235/6)	Cell Signaling	D57.2.2E	1:500 pH 9	overnight	Novolink	manual
HIF-1 α	Neomarkers	H1a67	1:50 pH 9	overnight	Novolink	manual
VEGF	Santa Cruz	SC152	1:250 pH 9	32 min	Ultraview	automação
KI67	Dako	MIB-1	1:150 pH 9	32 min	Ultraview	automação
Caspase-3	Cell Signaling	Asp175	1:300 pH 9	overnight	Novolink	manual
p53	Ventana	Do-7	PPU pH 9	32 min	Ultraview	automação
pRb	Novocastra	13A10	1:100 pH 9	overnight	Novolink	manual
Ciclina D1	Ventana	DO-7	PPU pH 9	32 min	Novolink	automação

As lâminas de TMA e recortes inteiros foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 min, reidratadas em soluções decrescentes de etanol, e então lavadas em água. A recuperação antigênica foi obtida a partir de tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0, utilizando panela de pressão ou banho a 96°C. Após a recuperação antigênica foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 min, seguido da aplicação de Protein Block (Dako Cytomation) por 20 min. As lâminas foram então incubadas de acordo com cada protocolo. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com o complexo secundário. A revelação utilizou o substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração, a hematoxilina. Todas as reações foram feitas acompanhadas de um controle positivo, estabelecido previamente para cada anticorpo testado.

3.2.2.2 Quantificação da expressão proteica

A expressão de cada anticorpo foi quantificada em microscópio ótico, por um observador, de acordo com a metodologia descrita abaixo. Nos TMAs, o escore final foi a média obtida em cada representação (quadruplicata ou duplicata), enquanto nos recortes inteiros foi atribuído um escore único, observando-se toda a lâmina e contabilizando 5 campos de médio aumento, representativos da heterogeneidade da lesão (quando presente).

Proteínas relacionadas ao ciclo celular (Ki67, p53, pRb e ciclina D1) e caspase-3:

Cada marcador foi avaliado quanto à porcentagem de expressão nuclear em células positivas. Para os marcadores de proliferação (Ki67) e apoptose (caspase-3), o escore foi calculado como índice, variando de 0-100 de acordo com a porcentagem de núcleos positivos. Os marcadores p53, pRb e ciclina D1 foram categorizadas em escore negativo (0%), e os casos positivos em escore 1 (1-25%), escore 2 (26-50%), escore 3 (51-75%) e escore 4 (76-100%). Como a expressão nos casos positivos apresentou-se forte e homogênea, a intensidade de expressão não foi acrescida à metodologia de quantificação de expressão.

Proteínas relacionadas à via mTOR (PTEN, phosAKT, phoS6) e induzida por hipóxia (HIF1 α , VEGF): Cada marcador foi avaliado quanto à porcentagem de células positivas (0-100%) em padrão nuclear para HIF, nuclear ou citoplasmático para phosAKT e PTEN e citoplasmático para phoS6 e VEGF, e à intensidade da marcação (0-3+), multiplicados em um escore final (H-score). Como a porcentagem de células positivas (em variável contínua) não mostrou diferenças em relação ao H-score durante as análises estatísticas, a primeira foi adotada como metodologia padrão.

Categorização da expressão proteica em amostras tumorais: Considerando-se expressão negativa (escore final igual a zero) como uma categoria separada, foram criadas outras duas categorias de valores positivos (escore final maior que zero), por análise de *cluster*, a partir da subtração entre os valores de expressão em tumores e os valores de expressão em amostras periféricas pareadas; a seguir, o valor do ponto de corte foi obtido por curva ROC, para cada proteína.

3.2.3 Extração do RNA e tratamento com DNase para RT-PCR em tempo real

Os tecidos congelados foram seccionados por criostato e submetidos à análise histológica. Somente aqueles com mais de 70% de células malignas foram selecionados para extração de RNA e miRNA, processo voltado à constituição do Banco de Macromoléculas. Cinco amostras que representavam exclusivamente o tecido urotelial periférico, histologicamente não neoplásico, foram extraídas e incluídas nos ensaios como controle não neoplásico (“periférico”).

Em correspondência com os recortes histológicos, algumas amostras foram dissecadas manualmente para descarte dos segmentos não neoplásicos (lâmina própria, camada muscular, tecido adiposo, fibrose, inflamação peritumoral ou outros contaminantes). Nesta etapa, cerca de 30mg de cada tecido congelado foram homogeneizados pelo equipamento Precellys 24® (Carlsbad, California, USA) e o RNA total purificado usando o miRNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands) em sistema automatizado.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia,

EUA). O RIN (*RNA Integrity Number*) (SCHOEDER et al., 2006) médio das amostras analisadas foi de 8.72;

O RNA total foi incubado em solução Tris HCl 20 mM pH 8.4, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM e 1U de DNase I/ug de RNA por 15 min, sendo o conteúdo enzimático inativado pela adição de EDTA 2,5 mM e incubação a 65°C por 10 min. A seguir, as amostras foram precipitadas por 16 h a -20°C em solução de acetato de sódio 0,2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e centrifugadas. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 75% e centrifugado. O precipitado foi então seco e ressuspenso em água livre de DNase/RNase.

3.2.4 Expressão gênica

3.2.4.1 Síntese de cDNA e ensaio de RT-PCR para mRNA (TaqMan Universal PCR Master Mix)

A reação de síntese do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no *kit* High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A reação teve volume final de 20,0 µl contendo 1 µg de RNA total, 2,0 µl de RT Buffer, 0,8µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0 µl de 10X Random Primers, 1,0 µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 1,0 µl de inibidor de RNase. Seguiu-se incubação a 25°C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85°C por 5 min, com termociclador. Os cDNAs sintetizados foram diluídos em água livre de DNase/RNase.

O ensaio RT-PCR foi conduzido de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit* TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), conforme descrito a seguir e para os seguintes genes, contidos em uma placa adquirida comercialmente (TaqMan):

PTEN (Hs02621230_s1)
AKT1 (Hs00178289_m1)
RPS6 (Hs01058685_g1)
EIF4E-BP1 (Hs00607050_m1)
HIF1 (Hs00153153_m1)
MKI67 (Hs01032443_m1)
CASP3 (Hs00234387_m1)
TP53 (Hs01034249_m1)
RB1 (Hs01078066_m1)
MTOR (Hs00234508_m1)

As reações foram feitas em volume final de 20,0 µl contendo 10 ng de cDNA 10,0 µl do TaqMan Universal Master Mix (2X) (contendo MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaqGold)) 1,0 µl de cada ensaio com TaqMan Gene Expression Assays (contendo a sonda e os oligonucleotídeos específicos para os genes a serem validados). A amplificação foi realizada no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), em 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60 °C por 1 min, precedidos por um período de 50°C por 2 min e 95 °C por 10 min. A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar, onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

3.2.4.2 Quantificação da expressão gênica

O nível de expressão gênica das 78 amostras tumorais e 5 amostras de tecido urotelial não neoplásico foi quantificado relativamente à expressão de um gene endógeno (constitutivo), calculado pelo software Genorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) que, através da análise do perfil de amplificação dos genes, calcula aquele cuja expressão é mais estável no conjunto de amostras. Foram testados os genes

GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase), *18S*, *ACTB* (β -actina), *B2M* (β 2-microglobulina), *HPRT* (hipoxantina – guanina fosforibosil transferase), *TBP* (Tata box protein). Foi eleito como “gene endógeno” pela ferramenta, a média da expressão de *ACTB* e *HPRT*.

Na sequência, para cada gene, os valor de expressão (E) de cada amostra tumoral (E_{tumor}) foi dividido pela média geométrica da expressão do conjunto de 5 amostras de urotélio não neoplásico (E_{benignos}). A partir deste valor ($E_{\text{tumor}}/ E_{\text{benignos}}$), foi obtido um escore, a fim de transformar os níveis de expressão dos diferentes genes em escalas comparáveis do ponto de vista gráfico. O escore foi calculado por lógica *fuzzy*, onde o valor final de uma determinada amostra representa a distância de seu valor “ $E_{\text{tumor}}/ E_{\text{benignos}}$ ” ao percentil 75 do conjunto de todas as amostras.

3.2.5 Expressão de miRNAs

3.2.5.1 Síntese de cDNA e reação RT-PCR para miRNA (TaqMan Human microRNA Array)

A reação de síntese do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit* TaqMan MicroRNA RT Reverse Transcription (Applied Biosystems), em um volume final de 7,5 μ l contendo: 500 ng de RNA total, 0,8 μ l de RT Buffer, 0,2 μ l de dNTP Mix (100 mM), 0,8 μ l de Megaplex RT Primers (*stem-loop* primers, específicos para miRNAs maduros), 1,5 μ l da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ l), 0,1 μ l de inibidor de RNase (20 U/ μ l), 0,9 μ l de MgCl₂. A reação foi incubada em 40 ciclos de 16 °C por 2 min, 42 °C por 1 min e 50 °C por 1 s, seguidos por um período de incubação a 85 °C por 5 min, em um termociclador.

Os microRNAs foram analisados utilizando-se o TaqMan Human microRNA Array Pool A (Figura 6), contendo 377 miRNAs (funcionalmente definidos e amplamente expressos em tumores), além de 3 miRNAs controle. O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit* Megaplex Pools for microRNA Expression Analysis. A reação ocorreu em volume final de 900,0 µl contendo 6,0 µl de cDNA, 450,0 µl do TaqMan Universal Master Mix (contendo MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, DNA polimerase modificada (AmpliTaqGold)) e 444,0 µl de água livre de DNase/RNase).

A amplificação deu-se em 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, precedidos por um período de 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Obtiveram-se os valores quantitativos (Ct) a partir do ciclo limiar, onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

3.2.5.2 Análise da expressão de miRNA

O nível de expressão de cada miRNAs foi quantificado relativamente à expressão dos miRNAs controles (RNU44, RNU48 e U6), gerando o Δ Ct da amostra e, a seguir, normalizados em relação ao valor de expressão de “miRNA calibrador”, que corresponde à média geométrica da expressão do conjunto de 5 amostras de urotélio periférico não neoplásico, ou “ Δ Ct calibrador”. O resultado final (E_{miRNA}) é expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao controle endógeno e ao valor calibrador, da seguinte forma:

$$E_{miRNA} = 2^{-(\Delta Ct amostra - \Delta Ct calibrador)}$$

3.2.6 Análise Estatística

Foi considerado, para todo o estudo, risco alfa menor ou igual a 5% de cometer erro tipo I ou de 1ª espécie e risco Beta menor ou igual a 20% de cometer erro tipo II ou de 2ª espécie.

Expressão gênica, proteica e variáveis clínico-patológicas: Os dados contínuos e semi-contínuos das variáveis foram comparados com a curva de Gauss e determinados como não paramétricos através do teste de Distância K-S (Kolmogorov-Smirnov) e pelo teste de Chapiro-Wilks e, por isso, foram representados em mediana e percentis (25 - 75). Também foi utilizada a média geométrica, quando a amostra apresentava alta frequência de valores modais (>20%). Variáveis categóricas dicotômicas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney com a correção de Bonferroni e, quando categorizadas em três ou mais grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com a correção de Bonferroni e pós-teste de contraste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Escore de expressão gênica: Os valores de expressão de mRNA foram ajustados, utilizando a lógica *fuzzy*, assumindo o grau de pertinência um (01) ao valor calculado pelo percentil 75% de cada variável, transformando assim os valores em uma escala de pertinência, o que possibilitou a comparação das diferentes variáveis entre si. Os dados categóricos foram representados por frequência absoluta (n) e relativa (%), sendo que as matrizes de contingências foram analisados pelo teste de Qui-quadrado de Pearson e as matrizes complexas (2x3, 3x4 ...) foram particionadas em matrizes simples (2x2), para melhor determinação da causalidade.

Categorização da expressão proteica: Para criar categorias, os valores de expressão proteica foram submetidos a análise por *cluster*, seguido de curva ROC.

A análise de *cluster* hierárquica foi realizada para identificar semelhanças individuais na resposta do questionário sobre perfis de sintomas e um *cluster* k (método

por indivíduos), para tentar identificar, por indivíduos, se é possível determinar, a partir de cada um dos grupos, ao qual pertencem. O algoritmo forma os *pré-clusters*, que são *clusters* dos casos originais, substituindo-os com objetivo de se ter um menor número de casos para a próxima etapa, reduzindo o tamanho da matriz que contém as distâncias entre todos os casos pareados possíveis. Essa estratégia representa uma abordagem de agrupamento sequencial. O algoritmo faz uma varredura dos registros, um a um, e decide se o registro atual deve fundir-se com os *clusters* formados anteriormente ou iniciar um novo *cluster* com base no critério da distância. Após a finalização da pré-clusterização todos os casos em um mesmo *pré-cluster* são tratados como uma única entidade, sendo então utilizados como novos casos, com uma técnica baseada em suas características. O tamanho da matriz de distâncias não é mais dependente do número de casos, mas do número de *pré-clusters*. O método "Two Step" pontua a qualidade da clusterização com valores entre 0 e 1: valor adimensional. Quanto mais próximo a 1, melhor é a clusterização, com menos casos sendo deixados à margem dos *clusters*.

A curva ROC foi utilizada para determinação do ponto de corte frente aos resultados da análise de clusters. Para tal, foi utilizada a área sob a curva (AUC), tanto a área total como a semi-área, para comportamentos bimodais por análise visual da topografia da curva quanto ao seu comportamento assintótico. O ponto e nota de corte de cada variável foram determinados pelo maior valor da soma entre a sensibilidade e a especificidade, que corresponde ao ponto de maior inflexão da curva ROC.

Análise dendrológica: A análise dendrológica, clássica de estudos em ecologia, parte de uma análise discriminante, seguida por análise de *cluster* aglomerativo por similaridade (*cluster*, *supercluster* I, *supercluster* II, etc). A análise dendrológica foi iniciada a partir da análise de multivariabilidade pelo método discriminante, para separar

variáveis de uma amostra em duas classes, determinadas pelo desfecho, a partir do método “stepwise” de igualdade de covariância de matrizes e utilizando o teste de Lambda de Wilks para determinação das variáveis com melhor discriminação. Seguiu-se, então, a análise de Mahalanobis para mensuração dos valores individuais da distância para centróide. Na última etapa, foi conduzida a análise de *cluster* para determinação da associação das variáveis de estudo à variável desfecho, as quais foram categorizada em dois grupos distintos e organizadas por ligação média dentro dos grupos. As associações e distâncias são organizadas como elementos de uma árvore, onde as folhas representam as variáveis de expressão e o comprimento entre os nós representam a distância entre elas, determinada pelo teste de correlação de Pearson, sendo que as variáveis similares encontram-se nas mesmas sub-árvores.

Expressão de miRNAs: Para a análise dos miRNAs, foi aplicado o teste estatístico paramétrico pelo método t-teste, com 1000 permutações, considerando $p < 0,05$, para identificar miRNAs diferencialmente expressos entre as categorias criadas para a expressão de phosS6, conforme descrito anteriormente. A seguir, estes dados foram submetidos a uma análise de *cluster* hierárquica não-supervisionada, com base na correlação de Pearson, para identificar subgrupos de pacientes nesse contexto.

Análise de sobrevida: Para a análise de sobrevida utilizou-se a Curva de Sobrevida de Kaplan-Meyer com teste de Log-Rank para determinação das variáveis de influencia. Para a regressão de proporcional de Cox, utilizou-se como variáveis candidatas aquelas que apresentaram significância menor ou igual a 20% na curva de sobrevida, pelo teste de Log-Rank, sendo que, na análise propriamente dita, as variáveis de menor influência foram retiradas uma a uma, até o modelo apresentar coesão ($p < 0,05$). Foi obedecido o modelo compartimental para o agrupamento das variáveis de interesse.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO GÊNICA

4.1.1 Análise descritiva da expressão gênica

Os genes estudados apresentam correspondência com as proteínas avaliadas pelo estudo (*MIK67* – Ki67; *CASP3* – Caspase-3; *TP53* – p53; *RBI* – pRb; *PTEN* – PTEN; *AKT1* – phosAKT; *RPS6* – phosS6; *HIF1* – HIF-1 α). A expressão dos genes *MTOR* e *EIF-4EBP1* também foi quantificada por RT-PCR.

A Tabela 4 mostra os valores de expressão de mRNA em amostras malignas e tecido urotelial periférico histologicamente benigno e os valores do escore de expressão gênica (vide Materiais e Métodos, seção 3.2.4.2).

Tabela 4 - Valores de expressão para cada gene, em amostras tumorais e de tecido urotelial periférico, de acordo com os níveis de expressão normalizada e escore de expressão gênica, expressos em medianas e percentis (P) ou média.

	Expressão gênica em tumores (n=78)			Expressão gênica em urotélio periférico (n=5)	Escore de expressão gênica (n=78)		
	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	Média geométrica	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
<i>MKI67</i>	2,75	1,88	3,99	0,55	0,52	0,30	0,95
<i>CASP3</i>	3,03	1,79	6,09	1,03	0,53	0,35	0,89
<i>TP53</i>	0,11	0,07	0,20	0,47	0,32	0,11	0,81
<i>RBI</i>	0,37	0,24	0,57	0,62	0,48	0,27	0,97
<i>PTEN</i>	12,47	6,11	33,03	1,33	0,52	0,32	0,82
<i>AKT1</i>	0,02	0,01	0,06	0,35	0,13	0,03	0,74
<i>MTOR</i>	2,13	1,15	5,17	0,35	0,10	0,02	0,65
<i>RPS6</i>	0,04	0,02	0,07	0,37	0,35	0,08	0,87
<i>EIF4EBP1</i>	13,93	7,62	27,19	0,51	0,21	0,06	1,02
<i>HIF1A</i>	0,11	0,06	0,28	0,37	0,14	0,04	0,87

Conforme esperado, observou-se que os genes relacionados à proliferação (*MKI67*) e apoptose (*CASP3*) apresentaram aumento dos níveis de expressão nos tumores em relação ao tecido periférico não neoplásico, enquanto genes de supressão tumoral, como *TP53* e *RBI*, apresentaram expressão diminuída em tumores. De maneira inesperada, apesar da expressão de *MTOR* mostrar-se elevada nos tumores, os níveis de expressão dos demais genes relacionados à via mTOR – *AKT1* e *RPS6* – mostraram-se reduzidos em relação às amostras periféricas, enquanto *PTEN*, potencial inibidor da via, mostrou-se aumentado nas amostras malignas. O gene *EIF4EBP1*, cujo produto exerce efeito inibitório na tradução proteica, também mostrou níveis de expressão elevados nos tumores. A expressão de *HIF1*, contudo, mostrou-se reduzida em amostras tumorais.

4.1.2 Análise dendrológica da expressão gênica

A análise dendrológica dos valores de expressão de mRNA (Figura 7) identificou uma associação linear positiva robusta entre *PTEN* e *HIF1A* ($r=0,71$ e $p<0,0001$). Este achado alocou o gene relacionado à via induzida por hipóxia no contexto dos genes da via mTOR. Os genes relacionados ao ciclo celular tiveram um comportamento independente, mostrando associação fraca com os demais conjuntos. O gene *AKT1* também mostrou uma associação forte com *CASP3* ($r=0,60$ e $p<0,001$), sendo que este conjunto relacionou-se mais ao *TP53* do que ao conjunto *PTEN-HIF1-RPS6*.

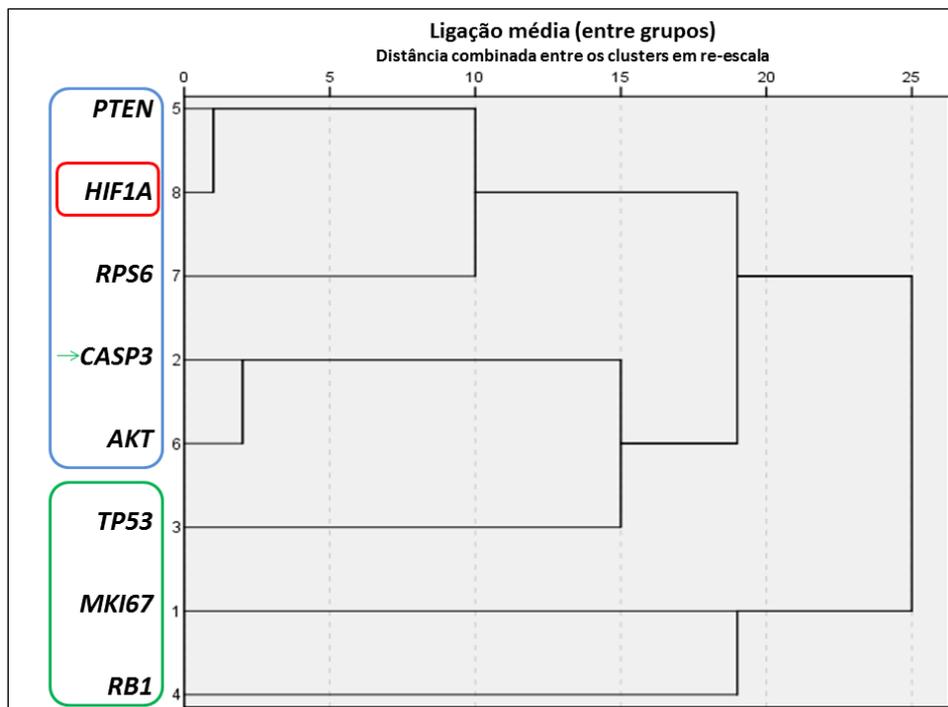


Figura 7- Análise dendrológica entre os níveis de expressão gênica em tumores (n=78), considerando os genes avaliados por RT-PCR, relacionados à via mTOR (azul), via induzida por hipóxia (vermelho) e ciclo celular e apoptose (verde).

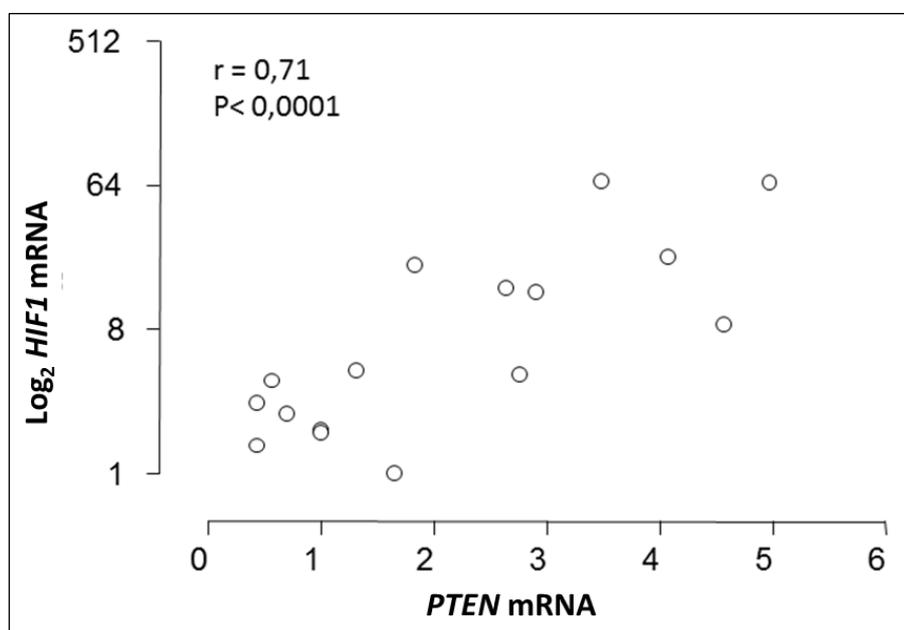


Figura 8 - Gráfico de dispersão entre os valores de expressão gênica de *PTEN* e *HIF1* (expresso em escala logarítmica), e coeficiente de correlação de Pearson (r), mostrando linearidade positiva.

4.2 EXPRESSÃO PROTEICA

4.2.1 Análise descritiva da expressão proteica

As Figuras 9 a 14 ilustram a expressão imunoistoquímica dos marcadores estudados em tecidos neoplásicos e não neoplásicos. A Tabela 5 dispõe os valores de expressão proteica para cada marcador, em mediana e percentis, em amostras tumorais e de urotélio periférico histologicamente benigno.

O índice proliferativo em amostras tumorais variou entre 5% e 97%, com média de 29.2% (DP=21.8) e mediana de 25%. Em tecidos periféricos, não houve expressão do marcador (score 0) em 65/78 amostras analisadas; nos casos positivos, a média e mediana foram, 8.1% (DP=7.0) e 5%, respectivamente. A superexpressão de p53 (score 4) foi vista em 20/99 tumores e em nenhuma amostra de tecido periférico. Entretanto, a maior parte (60/99) das amostras malignas apresentaram score ≤ 1 . A perda completa (score 0) da expressão de pRB e ciclina D1 foram eventos exclusivos de amostras malignas, tendo sido observados em 21/99 e 28/99 tumores, respectivamente, porém não houve similaridade em outras situações. Tanto em amostras periféricas quanto em amostras malignas com expressão positiva (score $\neq 0$), predominou score 4 de pRb (73/82 periféricas e 66/78 tumores positivos) e score ≤ 2 de ciclina D1 (78/79 periféricas e 47/71 tumores positivos). A hiperexpressão de ciclina D1 (score 4) foi observada em apenas 6/99 amostras tumorais e em nenhuma amostra de tecido periférico.

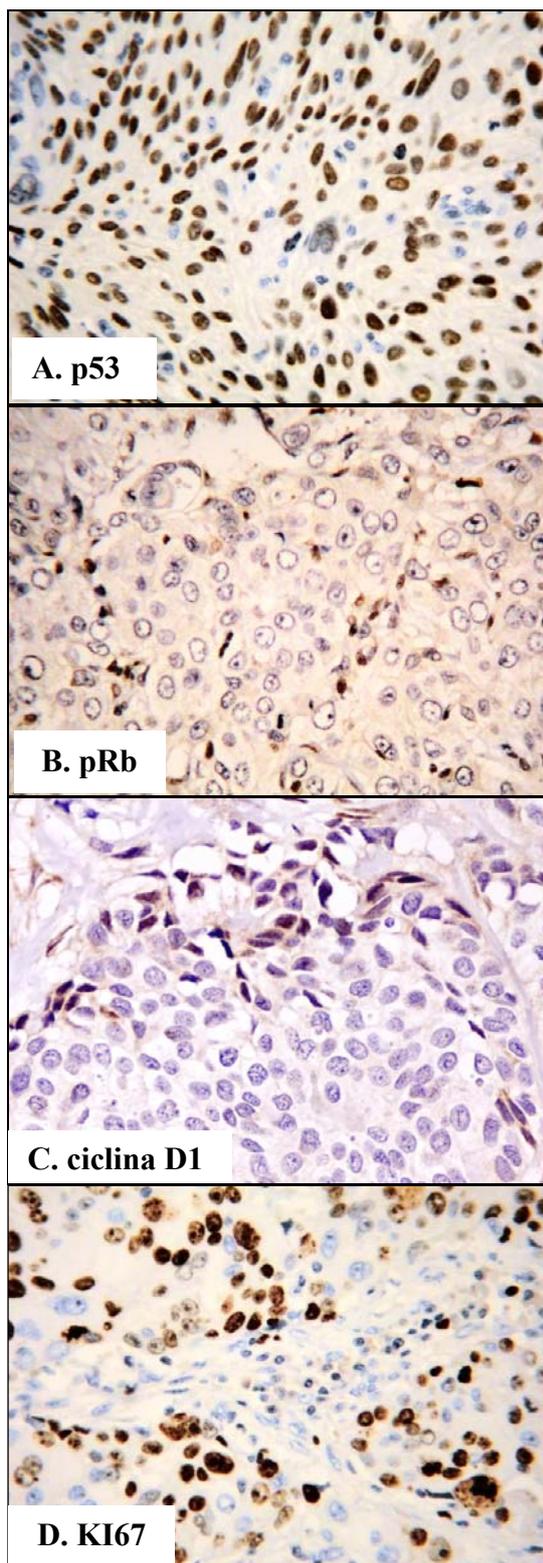


Figura 9 - Fotografia por microscopia ótica, 40X. Expressão imunoistoquímica das proteínas relacionadas ao ciclo celular, em amostras de tumores uroteliais. Expressão de p53 - positividade nuclear em >75% das células, escore 4 (A); Perda da expressão de pRB (B) e ciclina D1 (C) - expressão “negativa” do marcador, escore 0, com controles internos positivos; Índice de proliferação celular elevado - Ki67 positivo em padrão nuclear, em 65% das células (D).

A perda completa da expressão de PTEN (Figura 10) ocorreu em 29/95 (30%) tumores e em nenhuma amostra de urotélio periférico. Notou-se expressão positiva, de menor intensidade comparado aos controles internos, em regiões de *front* invasivo, sugerindo uma possível relação com o fenômeno de transição epitélio-mesenquimal.

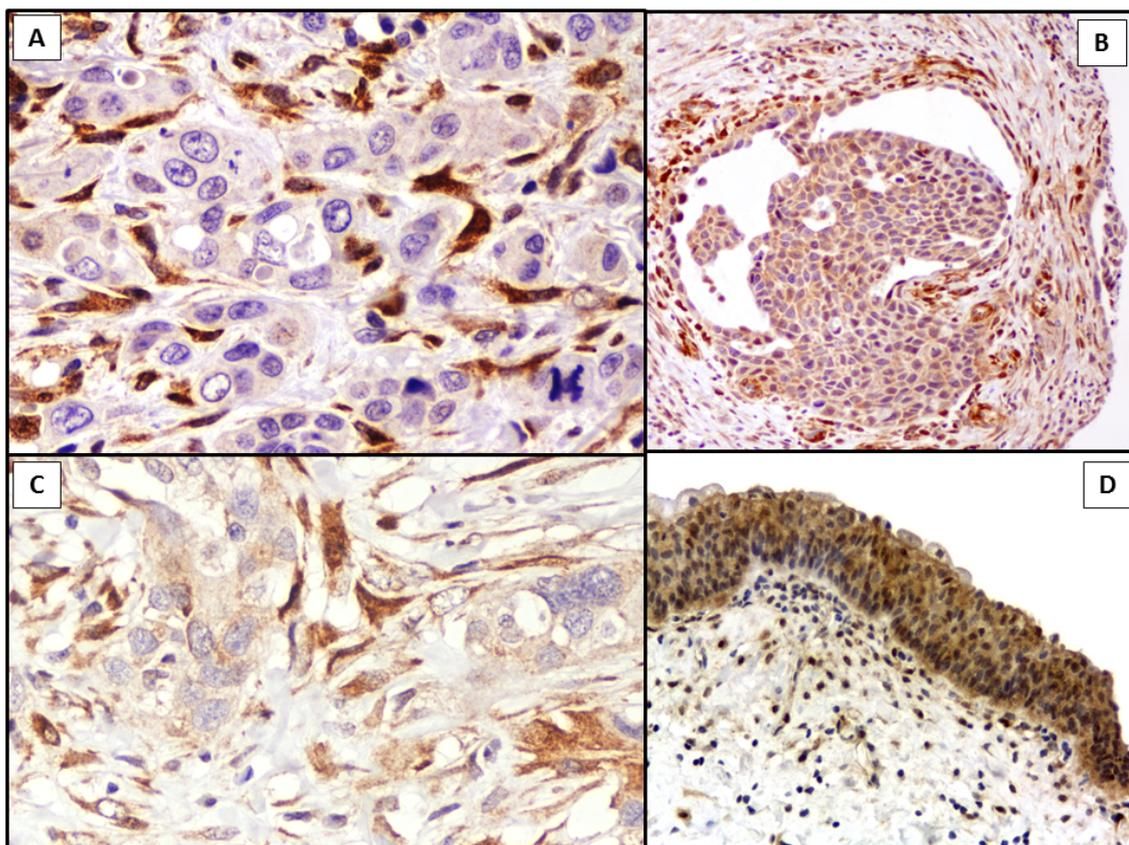


Figura 10 - Fotografia por microscopia ótica. Expressão imunoistoquímica de PTEN. Perda da expressão de PTEN em um tumor invasivo, com controle interno em fibroblastos (A, 40x). Expressão positiva de PTEN em *front* invasivo de um êmbolo vascular (B, 10x) e área de desmoplasia (C, 40x). Urotélio periférico histologicamente benigno, com manutenção da expressão de PTEN (D, 10x).

Todas as amostras de tecido periférico (55/55) expressaram phosAKT em >20% das células, enquanto apenas 32/94 (34%) amostras malignas excederam 20% de positividade. A perda completa da expressão de phosAKT ocorreu em 29/94 tumores. As células positivas mostraram-se em situação mais superficial, enquanto células em

situação basal e de comportamento invasivo foram mais frequentemente negativas (Figura 11). Este padrão foi melhor apreciado em neoplasias de morfologia papilífera.

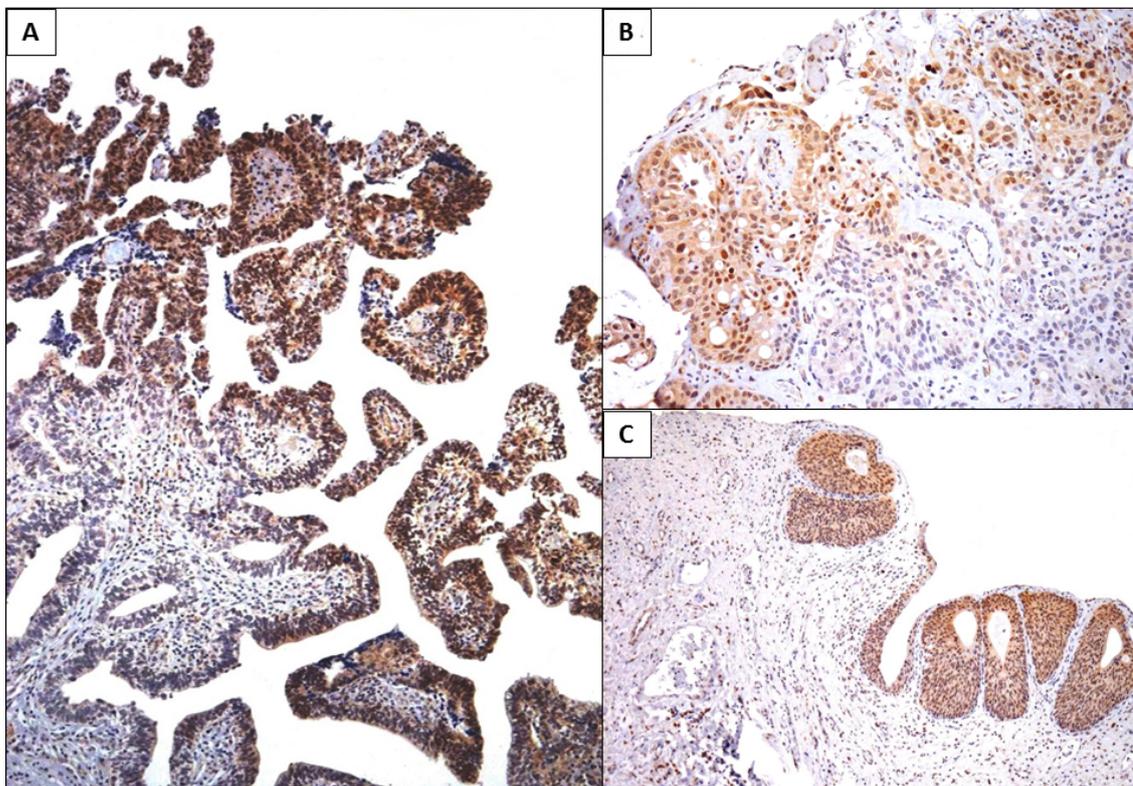


Figura 11 - Fotografia por microscopia ótica, 10X, Expressão imunoistoquímica de phosAKT. Expressão nuclear e citoplasmática de phosAKT em um tumor papilífero não músculo-invasivo (A), e em um tumor invasivo (B), ilustrando uma expressão preferencial em células mais superficiais. Expressão positiva e difusa em urotélio periférico histologicamente benigno (C).

O urotélio periférico mostrou manutenção da expressão de phosS6, sendo que 34/68 (50%) amostras avaliadas mostraram positividade em mais de 90% das células. A perda completa de expressão ocorreu em 44/95 (46%) tumores, sendo apenas 1 deles neoplasia não músculo-invasivo (vide Apêndice 1). A positividade de phosS6 ocorreu em apenas 10/29 tumores com perda completa da expressão de PTEN, e em 41/64 (64%) tumores positivos, sugerindo que a perda de PTEN não é um evento relacionado à positividade de phosS6. De maneira similar à expressão de phosAKT em tumores,

observou-se expressão preferencial de phoS6 em células de situação mais superficial (Figura 12).

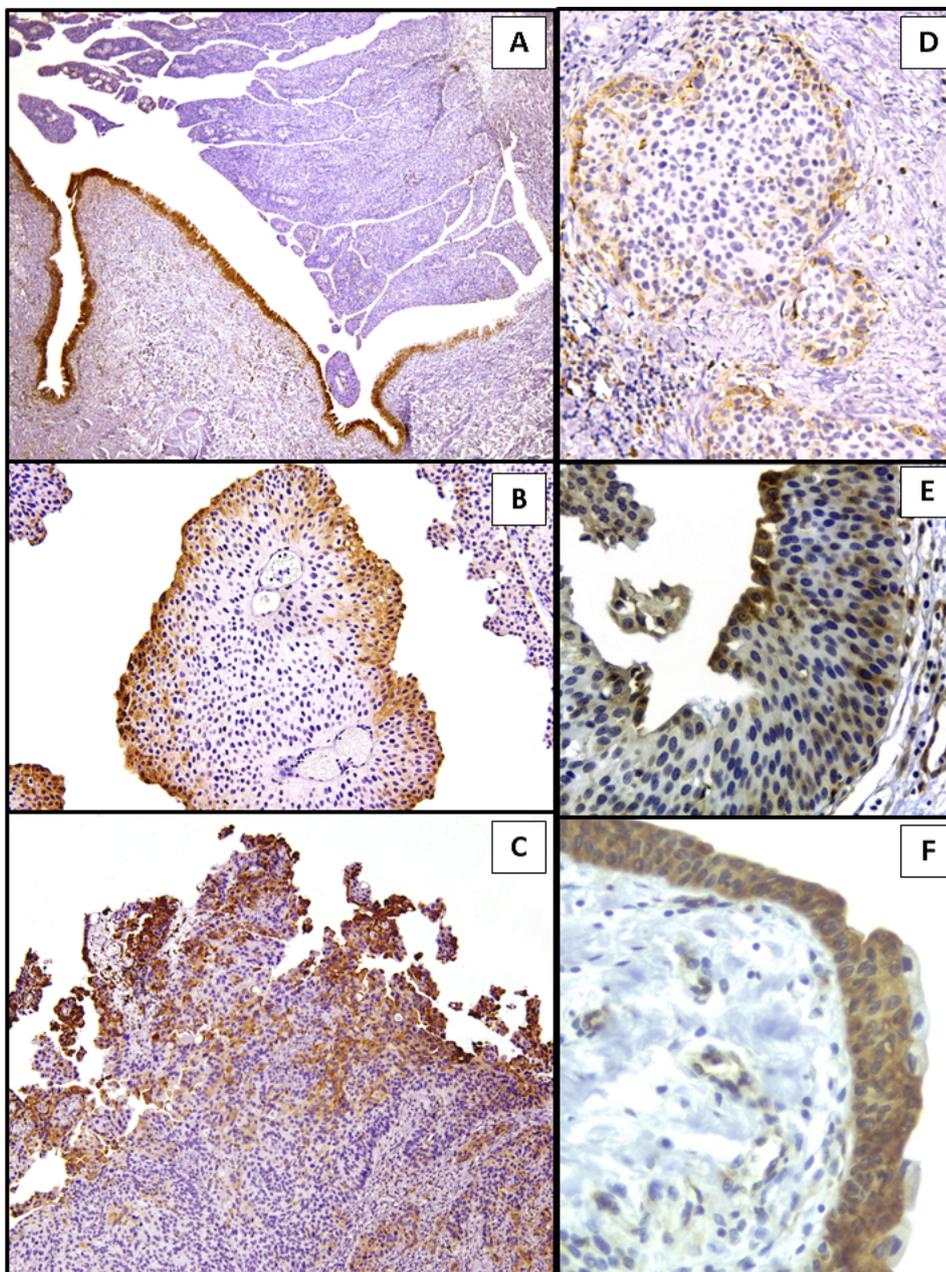


Figura 12 – Fotografia por microscopia ótica, Expressão imunoistoquímica de phoS6. Perda da expressão de phoS6 na transição do urotelio não neoplásico com uma neoplasia papilífera (A, 4x). Áreas positivas para o marcador mostraram expressão preferencial em células superficiais, tanto em regiões não invasivas (B, 10x), quanto invasivas (C, 10x). Expressão em células fusiformes da periferia de ninhos invasivos profundos também foi observada (D, 10x). Tecido urotelial periférico histologicamente benigno, com manutenção da expressão de phoS6 (E, 40x), muitas vezes de maneira difusa (F, 40x).

A perda completa de expressão de HIF-1 α (Figura 13) foi vista em 18/63 (29%) amostras periféricas e 32/95 (34%) neoplásicas e de VEGF (Figura 14) em 62% das amostras periféricas e neoplásicas (42/68 e 58/94, respectivamente). A média de expressão em casos positivos também foi semelhante entre os marcadores, tanto em amostras periféricas (23,3 e 32,2) quanto em amostras tumorais (19,8 e 21,9), para HIF-1 α e VEGF, respectivamente. A correlação da expressão entre os marcadores (HIF-1 α vs. VEGF) mostrou-se fraca entre amostras tumorais ($r=0,208$; $P=0,049$) e não significativa entre amostras periféricas ($P=NS$). Contudo, houve maior consistência entre amostras periféricas e tumorais correspondentes, observando-se correlação positiva forte de HIF-1 α ($r=0,625$, $P<0,001$) e moderada de VEGF ($r=0,322$ $P=0,008$).

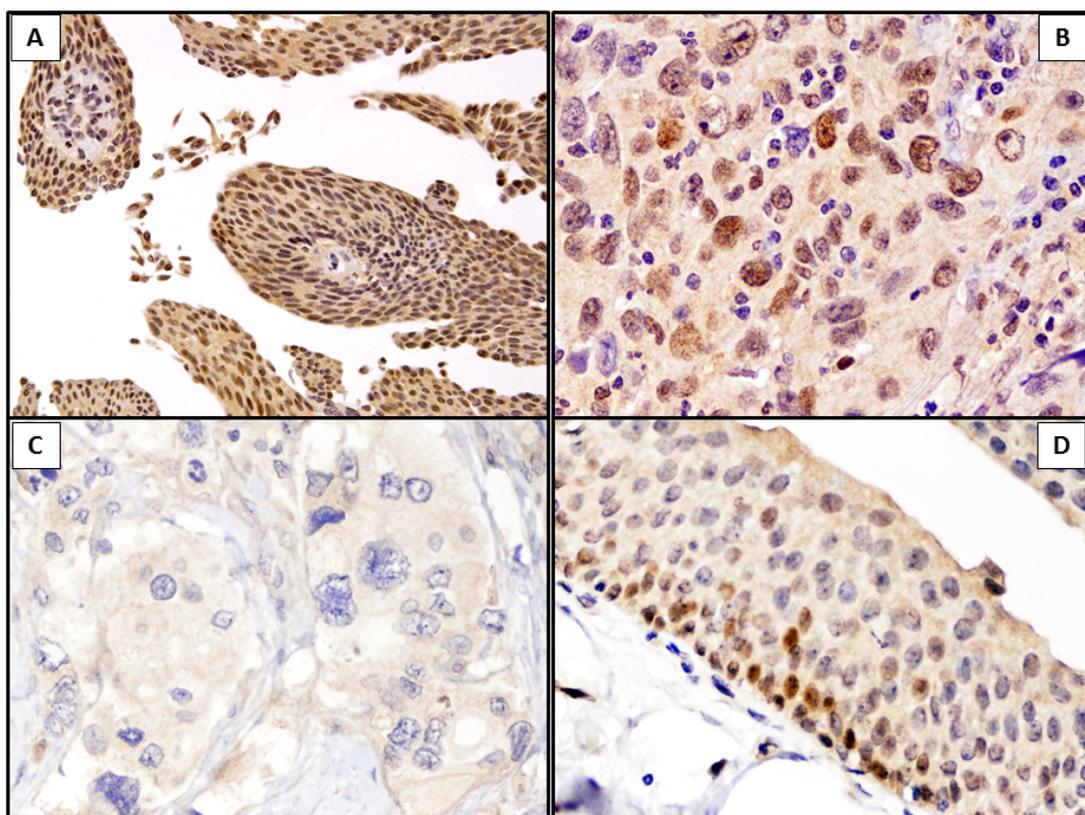


Figura 13 – Fotografia por microscopia ótica, Expressão imunoistoquímica de HIF-1 α . Expressão de HIF-1 α em um tumor papilífero (A, 10x) e em uma área de invasão associada a inflamação (B, 40x). Expressão negativa (score = 0) em um tumor invasivo (C, 40x) e positiva em cerca de 20% das células em urotélio periférico histologicamente benigno (D, 40x).

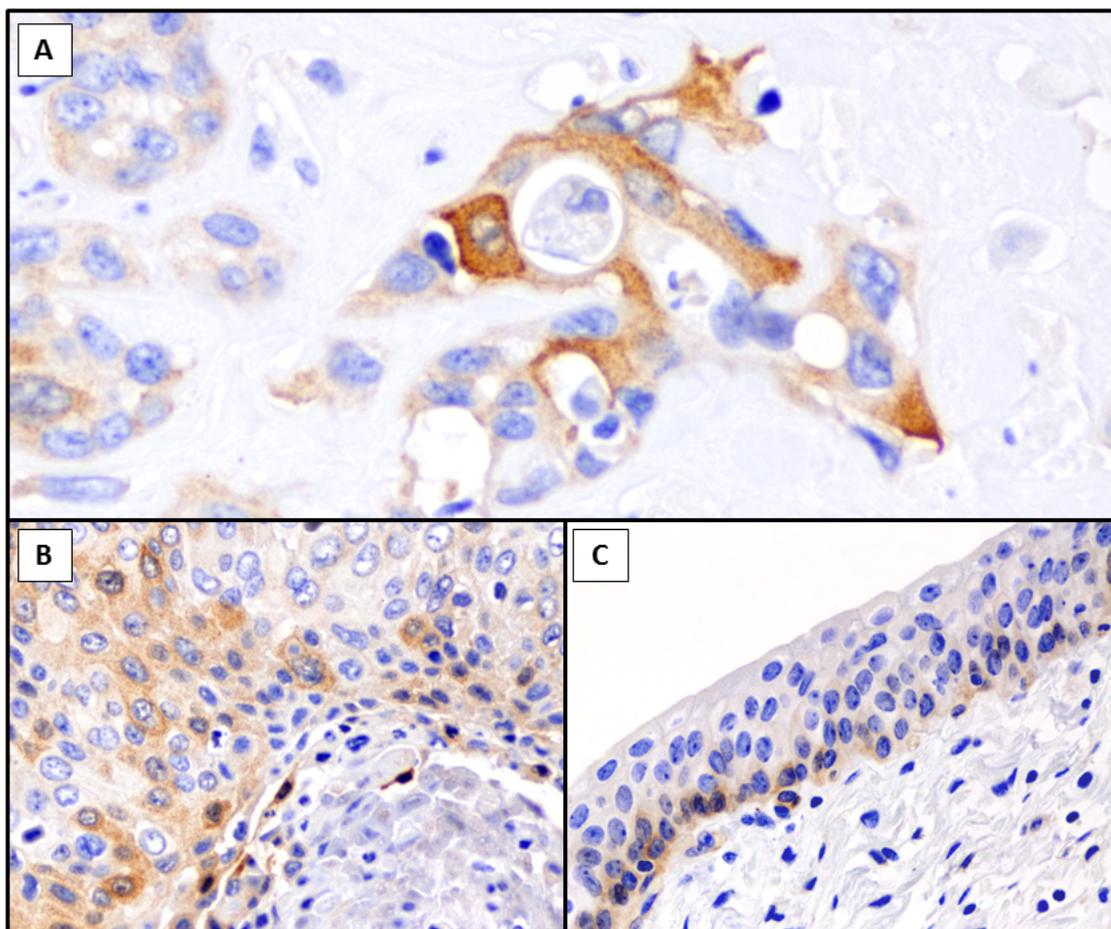


Figura 14 – Fotografia por microscopia ótica, 40X, Expressão imunoistoquímica de VEGF. Expressão de VEGF em um tumor invasivo (A) e em área adjacente a um foco de necrose (B). Positividade em cerca de 15% das células em urotélio periférico histologicamente benigno (C).

Os pontos de corte foram obtidos para criar variáveis categóricas (vide Materiais e Métodos, secção 3.2.2.2). Para tanto, utilizou-se análise por *cluster* da diferença entre os valores de expressão das amostras tumorais e periféricas (controle pareado), seguindo-se da determinação do ponto de corte por meio da geração de curva ROC.

Na maioria das proteínas estudadas, foi possível obter três categorias: uma de valores “negativos”, (ausência de expressão ou score 0) e duas de valores positivos, com exceção de: a) KI67, que não apresentou ausência completa de expressão em nenhuma amostra; b) pRB, que, por apresentar um grande número de casos em score

máximo (67/100 com escore=4), não permitiu categorização por análise de *cluster* dos valores positivos. Os pontos de corte para as proteínas ki67, caspase-3, p53, pRb, ciclina D1, PTEN, phosAKT, phosS6, HIF-1 α e VEGF foram, respectivamente, ≥ 32 , $\geq 1,8$, $\geq 1,9$, >0 , $\geq 1,8$, ≥ 55 , $\geq 25,2$, $\geq 22,5$, $\geq 36,4$ e $\geq 42,5$.

Tabela 5 - Valores de expressão proteica em amostras tumorais e urotélio periférico, valores de subtração da expressão proteica (tumores – urotélio periférico) e distribuição do número de pacientes em cada categoria criada.

	Mediana de expressão proteica e percentis (P) 25 e 75						Expressão categorizada N(%)		
	Tumor (n=99)	P25 P75	Urotélio periférico (n=55)	P25 P75	Subtração (n=55)	P25 P75	escore igual a zero	valores intermédios	valores > ponto de corte
Ki-67	25	13 40	0	0 0	0	20 34	-	64 (66)	33 (34)
caspase-3	1	0 2	0	0 0	1	0 2	27 (29)	48 (51)	19 (20)
p53	1	0 4	0	0 0	1	0 4	30 (30)	35 (35)	34 (34)
pRB	4	4 4	4	4 4	-1	0 0	21 (21)	-	79 (79)
ciclina D1	1	0 2	1	0 1	0	0 1	28 (28)	32 (32)	39 (39)
PTEN	45	10 80	100	100 100	-80	-99 -27	29 (31)	28 (29)	38 (40)
phosAKT	5	0 20	70	50 80	-45	-70 -25	34 (34)	45 (46)	20 (20)
phosS6	10	5 20	90	10 100	-80	-95 -10	44 (47)	41 (44)	08 (09)
HIF-1α	5	0 20	10	0 20	0	-10 6	32 (34)	12 (13)	51 (54)
VEGF	0	0 10	20	0 70	0	-10 0	58 (62)	31 (33)	05 (05)

Tumores NMI foram mais frequentemente negativos para VEGF (72%) e positivos para phosS6 em níveis intermediários (92%) (Apendice 1). A expressão de phosS6 acima do ponto de corte foi exclusiva de tumores músculo-invasivos. A expressão de caspase-3 em valores acima do ponto de corte, por sua vez, foi infrequente em tumores músculo-invasivos. Dezesete/20 amostras com perda da expressão de pRb

foram tumores não órgão-confinados. A perda da expressão de ciclina D1 aumentou linearmente com o estadiamento, sendo que 20/27 casos com escore 0 (zero) ocorreram em tumores não-órgão confinados.

4.2.2 Análise dendrológica da expressão proteica

A análise dendrológica das amostras de urotélio periférico histologicamente benigno (Figura 15) mostrou associação preferencial entre proteínas de uma mesma via, classificando-as de maneira independente. As proteínas da via induzida por hipóxia (VEGF e HIF-1 α) associaram-se ao grupo de proteínas do ciclo celular (p53, ciclina D1, Ki67 e pRb) e caspase-3, em padrão de “cascata”. Esse conjunto apresentou fraca associação com o grupo de proteínas da via mTOR (phosS6, phosAKT e PTEN).

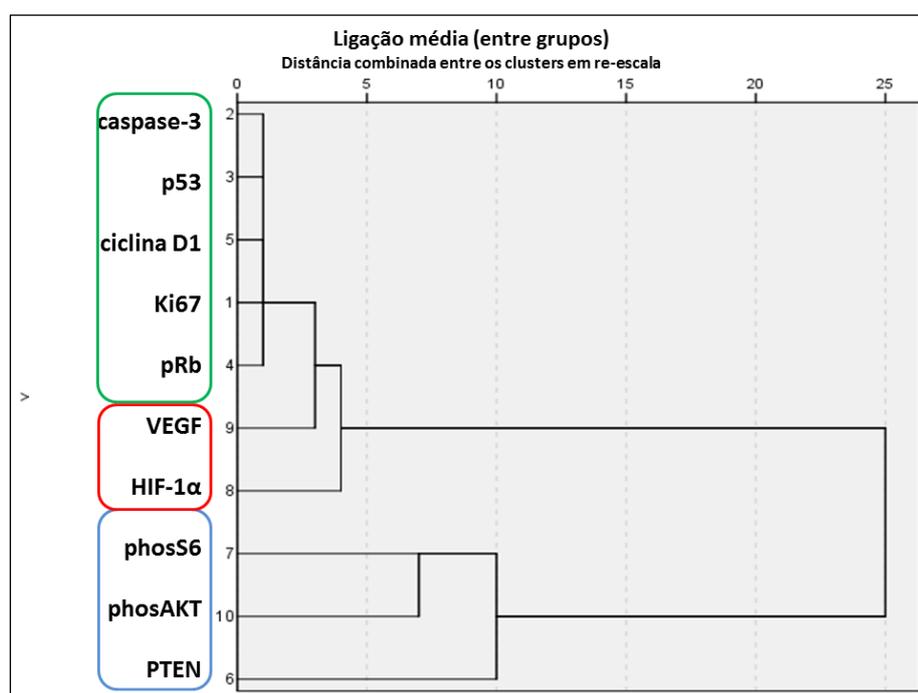


Figura 15 - Análise dendrológica entre os níveis de expressão proteica em urotélio periférico histologicamente benigno (n=55), considerando as proteínas analisadas por imunistoquímica, relacionadas à via mTOR (azul), via induzida por hipóxia (vermelho) e ciclo celular e apoptose (verde).

A análise dendrológica dos valores de subtração de expressão proteica (amostras tumorais e periféricas pareadas) (Figura 16) demonstrou diferenças importantes em relação ao dendrograma da expressão em amostras periféricas. A associação entre PTEN e HIF-1 α , observada no dendrograma da análise de expressão gênica, foi reproduzida na análise de expressão proteica, porém de forma bem menos robusta ($r=0,28$). Através dessa associação, as proteínas da via mTOR aproximaram-se da via induzida por hipóxia que, por sua vez, dissociou-se das proteínas do ciclo celular. A proteína pRb mostrou-se mais próxima da via mTOR do que das demais proteínas do ciclo celular. A análise mostrou, ainda, que a maior força de associação entre os níveis de expressão das proteínas estudadas ocorreu entre phosS6 e phosAKT, embora com intensidade fraca a moderada ($r=0,30$; $p=0,034$).

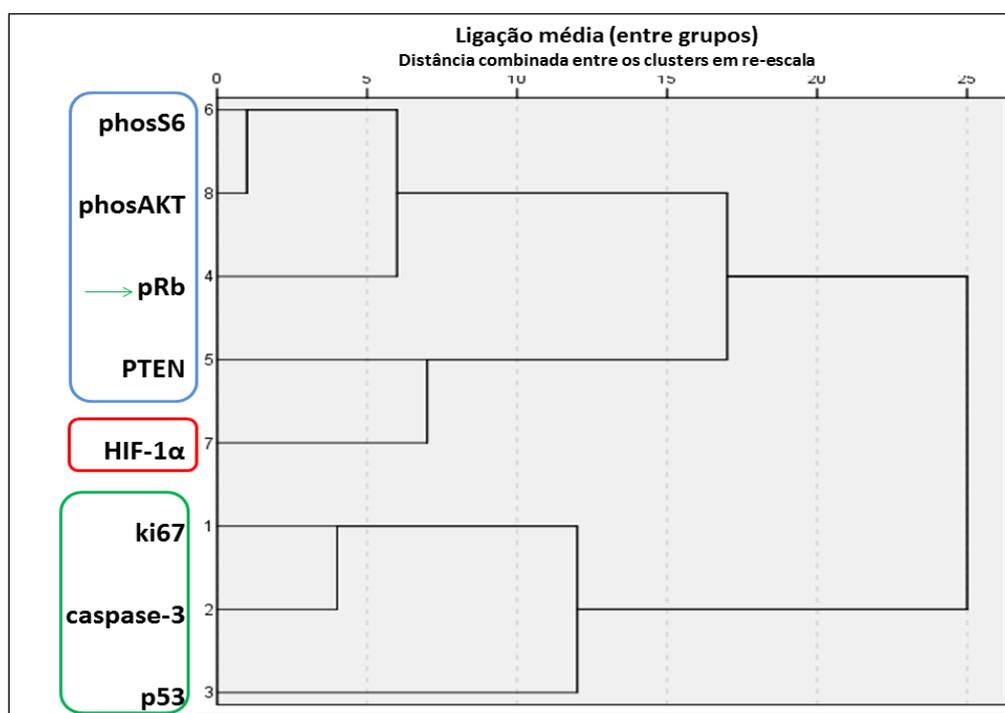


Figura 16 - Análise dendrológica dos valores de subtração de expressão proteica ($n=55$), considerando as proteínas analisadas por imunohistoquímica, relacionadas à via mTOR (azul), via induzida por hipóxia (vermelho) e ciclo celular/ apoptose (verde).

A associação HIF-1 α -PTEN foi positiva, embora marginalmente significativa ($p=0,0497$). A Figura 17 mostra a dispersão dos valores de expressão de PTEN e HIF-1 α , dividido em quadrantes baseados nos pontos de corte da expressão categorizada. A maioria das amostras apresenta baixa expressão de HIF-1 α , cuja localização predomina no primeiro quadrante ($n=21$), em que coincidem com baixos níveis de PTEN. Apesar da correlação positiva entre a expressão gênica (Figura 8) e a expressão proteica (Figura 17) de PTEN e HIF, é interessante notar que a expressão gênica de *PTEN* apresentou correlação negativa com a expressão proteica de HIF-1 α ($r = -0,30$; $p=0,074$) e VEGF ($r = -0,30$; $p=0,014$) (Apêndice 2)

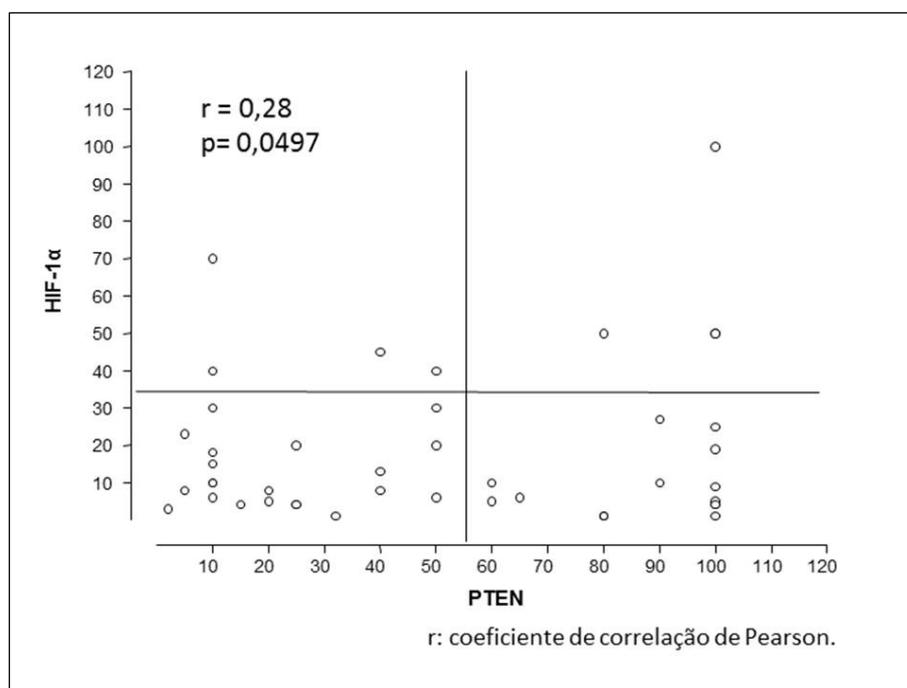


Figura 17 - Gráfico de dispersão entre PTEN e HIF-1 α , utilizando valores de expressão proteica.

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO PROTEICA E A EXPRESSÃO GÊNICA

Não houve correlação direta significativa da expressão entre as proteínas e genes correspondentes (Apêndice 2), com exceção de phosAKT – *AKT1* ($r = -0,27$; $p = 0,025$). Curiosamente, a expressão de phosAKT com outros genes relacionados à via mTOR mostrou força e valor de p muito similares, particularmente *PTEN* ($r = -0,25$; $p = 0,031$), *MTOR* ($r = -0,26$; $p = 0,026$) e *RPS6* ($r = -0,25$; $p = 0,028$).

De fato, entre proteínas e genes não correspondentes, observaram-se múltiplas associações. Com exceção da caspase-3, todas as proteínas analisadas correlacionaram-se com a expressão de pelo menos um gene. A expressão categorizada de phosS6, em especial, apresentou correlação apenas com a expressão de *AKT1*. Observou-se que em tumores com maior expressão de phosS6, a expressão de *AKT1* apresentou níveis transcricionais muito baixos (Tabela 6) (Figura 18).

Tabela 6 – Valores do escore de expressão gênica, de acordo com a expressão proteica categorizada de phosS6.

Gene	Mediana do escore de expressão de cada gene, nas categorias de imunoe expressão de phosS6			Valor de p		
	phosS6 = 0	phosS6 <22,5	phosS6 ≥ 22,5	Negativo vs < 22,5	< 22,5 vs ≥ 22,5	Negativo vs ≥ 22,5
<i>MKI67</i>	0,49	0,51	0,58	0,994	0,932	0,861
<i>CASP3</i>	0,45	0,58	0,33	0,456	0,097	0,175
<i>TP53</i>	0,33	0,30	0,32	0,792	0,949	0,892
<i>RB1</i>	0,56	0,48	0,38	0,879	0,509	0,714
<i>PTEN</i>	0,52	0,50	0,43	0,466	0,395	0,475
<i>AKT1</i>	0,13	0,38	0,04	0,313	0,032	0,043
<i>MTOR</i>	0,09	0,10	0,11	0,760	0,412	0,357
<i>EIF4EBP1</i>	0,24	0,18	0,18	0,374	0,298	0,171
<i>RPS6</i>	0,35	0,27	0,69	0,848	0,609	0,742
<i>HIF1A</i>	0,18	0,06	0,35	0,421	0,352	0,839

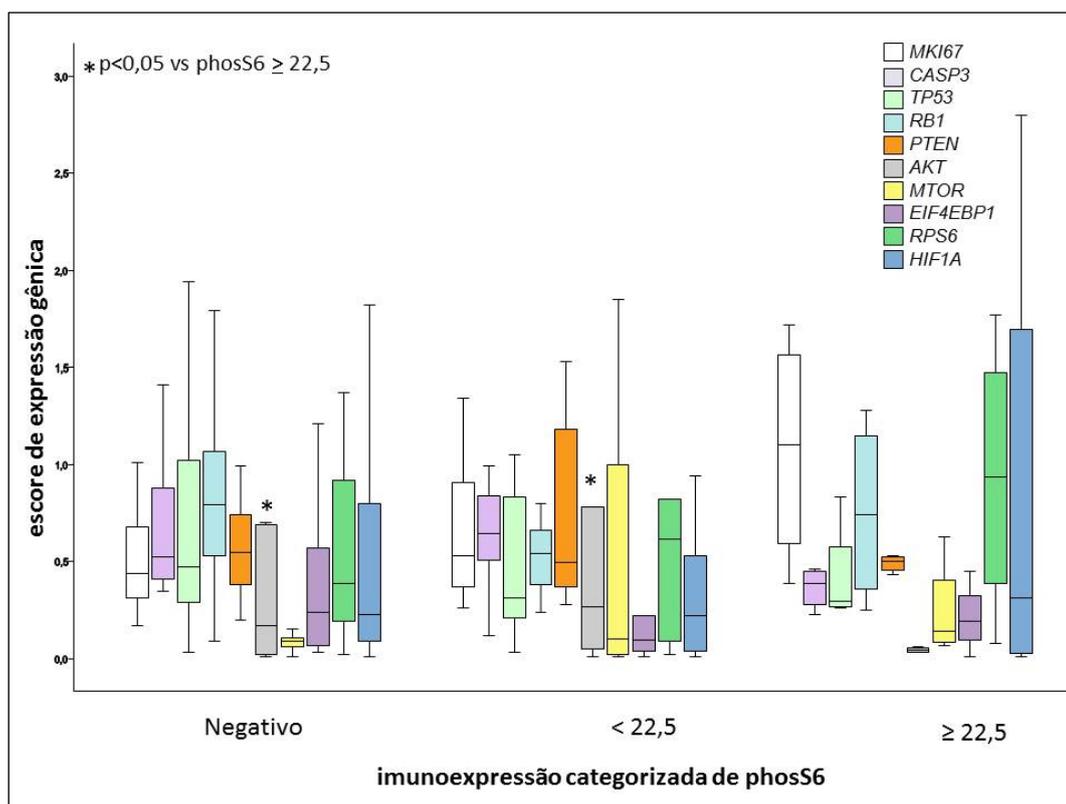


Figura 18 - Escore de expressão gênica, de acordo com a expressão proteica categorizada de phosS6. Tumores com alta expressão de phosS6 ($\geq 22,5$) apresentaram intensa redução dos níveis de expressão de *AKT1*, em comparação com tumores com expressão baixa (<22,5) ou negativa.

4.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DE miRNAs DE ACORDO COM A EXPRESSÃO DE phosS6

4.4.1 miRNAs diferencialmente expressos entre as categorias de expressão de phosS6

As amostras tumorais cuja extração de miRNA foi bem sucedida (n=72) foram categorizadas de acordo com a expressão de phosS6 e submetidas a análise paramétrica (teste *t* com 1000 permutações, considerando $p < 0,05$), para identificação de miRNAs diferencialmente expressos. Dos 72 casos, 34 (47%) apresentaram imunoposição negativa de phosS6, 30 (42%) níveis positivos porém baixos ($< 22,5\%$) e 8 (11%) níveis positivos elevados ($\geq 22,6\%$). A seguir, a análise não-hierárquica de *clusters* por correlação de Pearson identificou três grupos principais, designados *clusters* I, II e III, com 17 miRNAs diferencialmente expressos (Figura 19).

De maneira geral, o *cluster* I apresentou um perfil de hiper-regulação dos miRNAs e o *cluster* III de hiporregulação, enquanto que o *cluster* II mostrou comportamento intermediário. Sete das 8 amostras com níveis mais elevados de phosS6 classificaram-se no *cluster* III.

mir-130, mir29c, mir-655, mir-22, mir-382, mir-138 e mir-491 mostraram-se hiper-regulados nos *clusters* I e II e em níveis basais ou diminuídos no *cluster* III, enquanto mir-145, mir-204 e mir-330 mostraram-se hiporregulados em todos os grupos, embora mais acentuadamente no *cluster* III. Por outro lado, mir-328, mir-320, mir-125 e mir-493 mostraram-se hiper-regulados no *cluster* I e hiporregulados nos *clusters* II e III, e mir-518 hiporregulado nos *clusters* I e III e comportamento heterogêneo no *cluster* II.

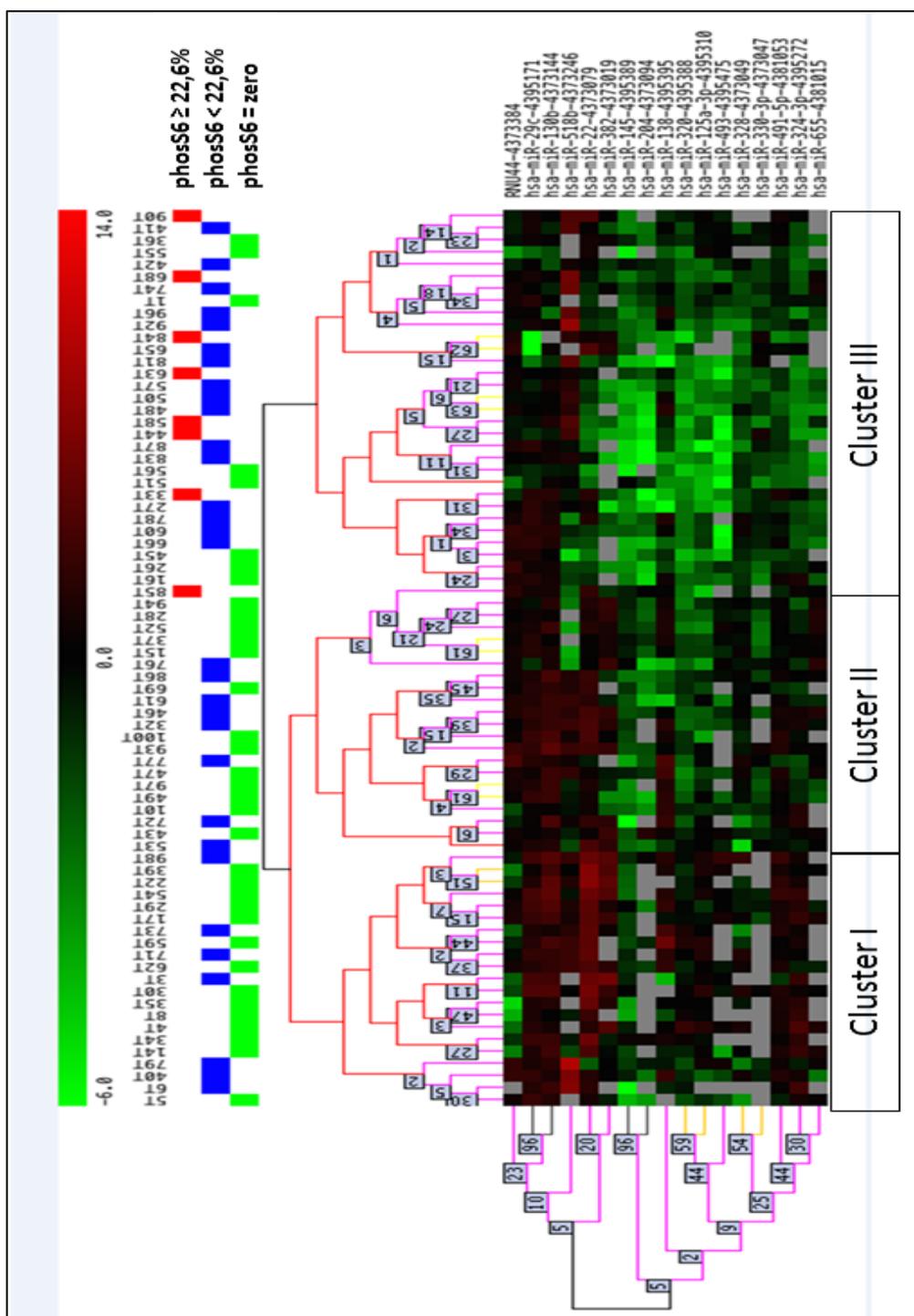


Figura 19 - Matriz de casos e miRNAs diferencialmente expressos entre tumores com expressão negativa, baixos níveis e altos níveis de phosS6. A análise classificou os tumores em três grupos. Em um deles, denominado *Cluster III*, predominou a hipo-expressão da maioria dos miRNAs. Este *cluster* abrigou 7/8 tumores com altos níveis de phosS6

4.4.2 Caracterização clínico-patológica dos *clusters*

As características clinicopatológicas foram diferentes entre os *clusters*, conforme demonstra a Tabela 7. Pacientes do *cluster* III apresentaram maior proporção de mulheres e idosos, com tumores de morfologia predominantemente papilífera e frequente multifocalidade. Em contrapartida, os demais pacientes (*clusters* I e II) apresentaram proporção homem:mulher de 3:1, com 29% dos pacientes não idosos, 93% dos tumores com morfologia não papilífera e frequente diferenciação escamosa. O estadiamento patológico categorizado diferiu entre os grupos, especialmente quanto à distribuição de doença NMI e MI-OC, mas não quando categorizados em “tumores confinados ao órgão” e “não confinados ao órgão”. Invasão perineural ou vascular e *status* nodal e de margens cirúrgicas também foram semelhantes entre os grupos. Em análise multivariada entre os três *clusters*, pertencer ao *cluster* III mostrou-se um fator preditor independente de sobrevida doença-específica favorável ($p=0,021$, CI: 0,2-0,9).

Tabela 7 - Características clínico-patológicas entre os pacientes categorizados como *cluster* III, em comparação com os demais pacientes (*cluster* I + *cluster* II).

	<i>clusters</i> I+II N=41	<i>cluster</i> III N=31	Valor de p (chi2)
Relação homens:mulheres	3 : 1	1 : 1	0,022
Idade <60	12 (29%)	05 (16%)	0,214
Doença multifocal	04 (09%)	11 (35%)	0,008
Morfologia papilífera	03 (07%)	11 (35%)	0,003
Diferenciação escamosa	14 (34%)	04 (13%)	0,039
Estadiamento pTa/pTis/pT1	02 (05%)	08 (26%)	
pT2	13 (32%)	06 (19%)	0,033
pT3/pT4	26 (63%)	17 (55%)	
Doença órgão-confinada	15 (36%)	14 (45%)	0,463
Invasão vascular	26 (63%)	16 (51%)	0,315
Invasão perineural	23 (56%)	14 (45%)	0,358
Linfonodos positivos	16 (39%)	13 (42%)	0,740
Margem comprometida	14 (34%)	05 (15%)	0,086
Sobrevida doença específica	49%	74%	0,028

4.5 VALOR PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS E GENES ESTUDADOS

O tempo de seguimento (percentil 75) foi de 8,15 anos na população viva e 2,21 anos nos pacientes que evoluíram com óbito, independentemente da causa (Figura 20). A taxa global de mortalidade foi 75,35% e a de mortalidade doença específica de 39,81%. O índice de progressão com metástases nodais e/ou à distância após cistectomia foi de 39,13%.

Variáveis clínicas e patológicas:

Os desfechos adversos foram mais frequentes na população masculina. Embora não tenha sido observada diferença em relação ao gênero quanto à classificação de ASA, uso de tabaco, número de comorbidades, complicações pós-cirúrgicas ou estadiamento patológico final, a proporção de homens foi significativamente maior nos tumores classificados como *Clusters* I+II pela análise de miRNA. A idade foi um fator impactante na sobrevida global, com uma média da população sobrevivente de 63.2 anos, 68.8 anos para os óbitos globais e 65.7 anos para os óbitos relacionados à doença. O tabagismo teve impacto na sobrevida global e doença específica ($p < 0,031$), sendo que fumantes e ex-fumantes apresentaram comportamento semelhante pela análise de Kaplan-Meier (Figura 21). Os três pacientes classificados como ASA I sobreviveram livres de doença até o último seguimento, enquanto 30 dos 69 (43%) pacientes classificados como ASA II apresentaram óbito relacionado à doença, 5 (7%) morte por complicação secundária ao tratamento e 4 (5%) morte por causas não relacionadas. Dentre os 31 pacientes classificados como ASA III, 27 (87%) evoluíram com óbito, 11

deles relacionados à doença. A informação sobre o diagnóstico no primeiro procedimento de RTU era disponível para 50 pacientes. Destes, 39 apresentaram doença músculo-invasiva ao diagnóstico, dos quais 28 progrediram com metástases nodais ou à distância após a cirurgia de cistectomia.

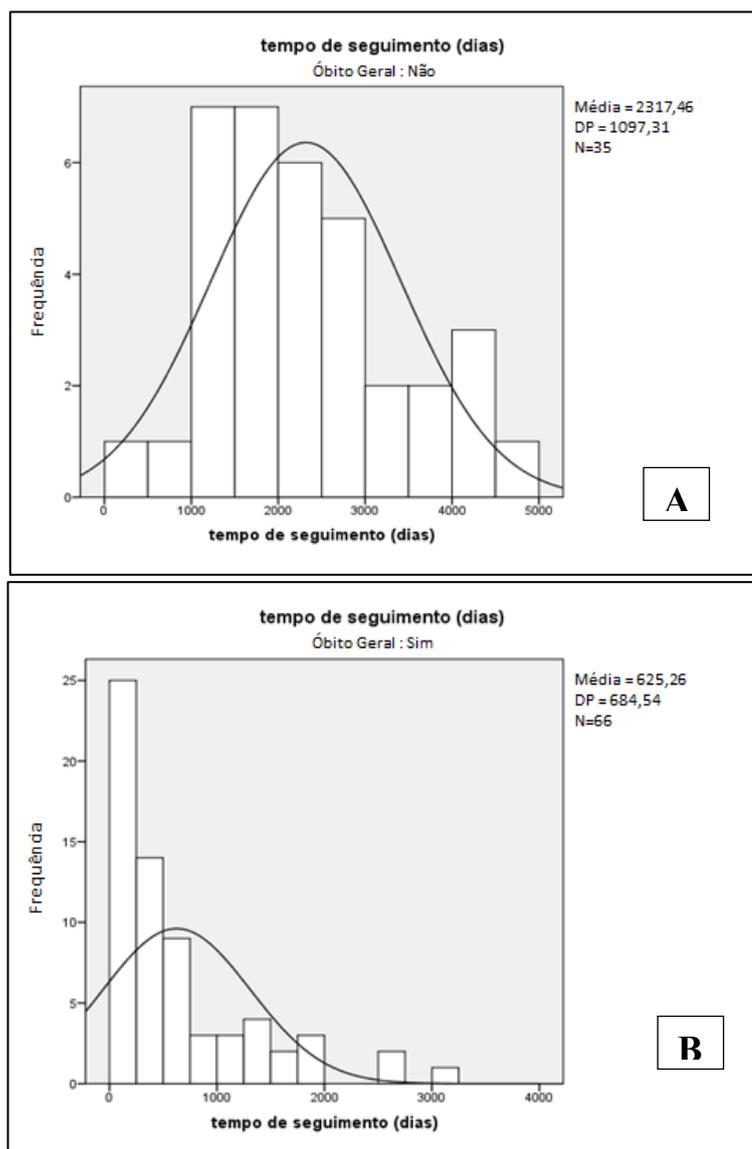


Figura 20 - Tempo de seguimento de acordo com óbito geral. (A) Pacientes vivos até o seguimento; (B) Pacientes que evoluíram com óbito independentemente da causa.

Variáveis de expressão proteica e gênica

A expressão das proteínas estudadas, em valores contínuos ou categorizada, não apresentou impacto significativo nos parâmetros de sobrevida. A categorização dicotômica da expressão proteica em casos positivos e negativos para cada marcador mostrou resultados mais relevantes pela análise de Kaplan Meyer (Tabela 8). Os tumores com expressão positiva para phosS6, HIF-1 α e VEGF, e expressão negativa para caspase-3 ($p < 0,183$), apresentaram melhor sobrevida doença específica. A expressão gênica em escore ou categorizada, não apresentou impacto sobre os parâmetros de sobrevida.

Tabela 8 - Variáveis clínicas, patológicas e de expressão proteica, candidatas ao modelo proporcional de Cox, que apresentaram impacto sobre a sobrevida doença específica (Kaplan-Meyer; $p < 0,2$).

Variáveis	Valor de p
Uso de tabaco (nunca fumou vs. fumantes e ex-fumantes)	0,031
Classificação de ASA (I+II vs. III)	0,165
Estadiamento patológico (pTa/pT1 vs. pT2/pT3/pT4)	0,007
Histologia (urotelial clássico vs. diferenciação adversa + variantes agressivas)	0,106
Morfologia microscópica (papilífero vs. não papilífero ou misto)	0,019
Invasão vascular (presente vs. não identificado)	0,025
Densidade nodal ($\leq 0,72$ x $> 0,72$)	0,105
Margens cirúrgicas (livres vs. comprometida por carcinoma in situ ou invasivo)	0,002
phosS6 (positivo vs. negativo)	0,030
Caspase-3 (positivo vs. negativo)	0,183
HIF-1α (positivo vs. negativo)	0,171
VEGF (positivo vs. negativo)	0,103

Análise de regressão proporcional de Cox (stepwise)

A análise multivariada (regressão proporcional de Cox) para sobrevida doença específica foi conduzida separadamente para as variáveis clínicas, patológicas e de expressão proteica. Dentre os parâmetros clínicos, o tabagismo foi a variável com valor preditivo independente de sobrevida, com *hazards ratio* de 2,293 (expectativa de vida 2,293 vezes menor para fumantes ou ex-fumantes). Dentre os parâmetros patológicos, o *status* das margens cirúrgicas foi a variável com valor preditivo independente de sobrevida, com *hazards ratio* de 0,346, correspondendo a uma expectativa de vida 2,89 vezes maior para pacientes com margens livres após a cirurgia de cistectomia. Dentre os parâmetros de expressão proteica, a expressão de phosS6 foi um fator preditor independente de sobrevida, com *hazards ratio* de 0,49, correspondendo a uma expectativa de vida 2,02 vezes maior para os pacientes cujos tumores apresentam positividade para a expressão da proteína. Na análise final, conforme demonstra a Tabela 9, estes três parâmetros permaneceram como preditores independentes de sobrevida doença específica. As curvas de sobrevida para cada um desses parâmetros são ilustradas nas páginas seguintes (Figuras 21, 22 e 23).

Tabela 9 - Análise de regressão de Cox (stepwise), envolvendo variáveis independentes, após as etapas de análise dos parâmetros clínicos, patológicos e de expressão proteica.

	valor de p	<i>Hazards Ratio</i>	Intervalo de confiança 95,0%	
			limite inferior	limite superior
Margem livre	.003	0.32	0.15	0.68
Tabagismo	.044	2.35	1.02	5.40
phosS6 positivo	.022	0.46	0.23	0.89

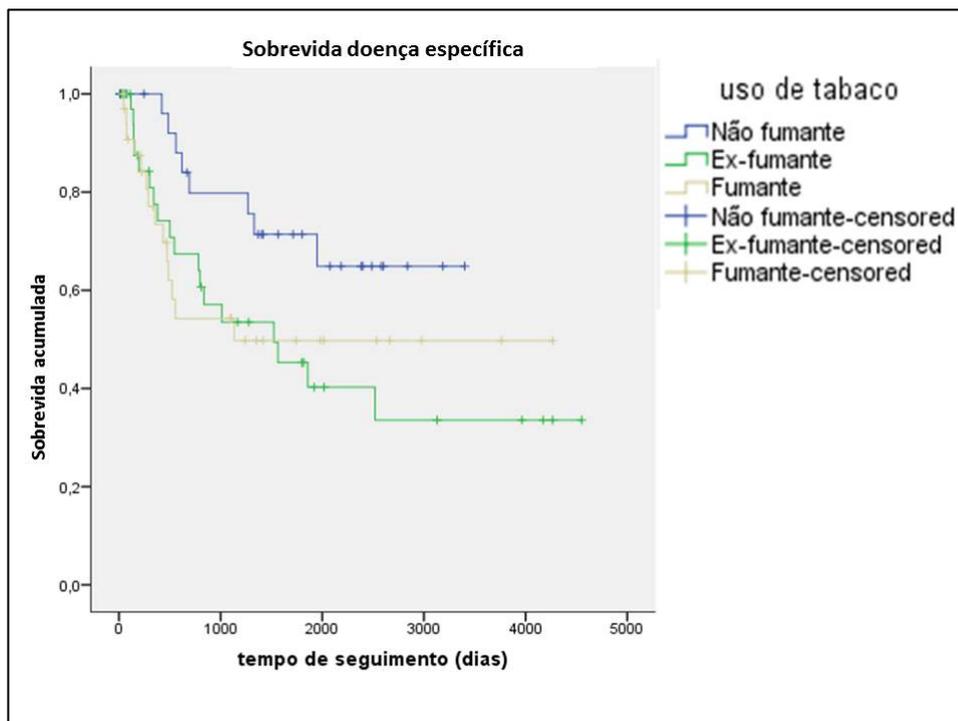


Figura 21 - Curva de sobrevida doença específica pela análise de Kaplan Meyer avaliando o impacto do uso de tabaco na coorte de estudo.

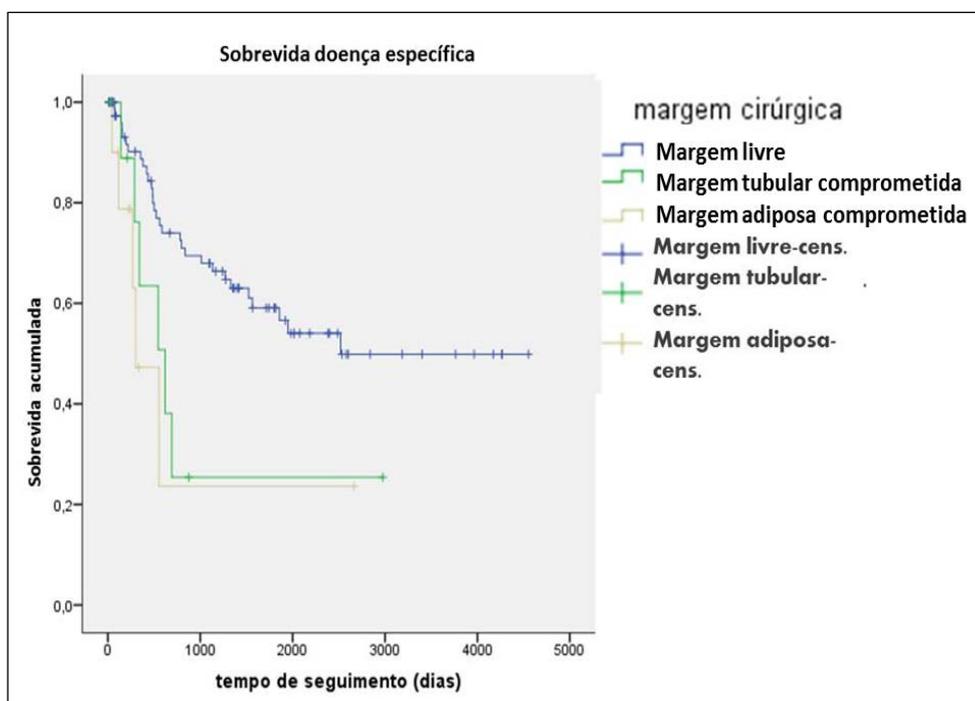


Figura 22 - Curva de sobrevida doença específica pela análise de Kaplan Meyer avaliando o impacto do status das margens cirúrgicas na coorte de estudo.

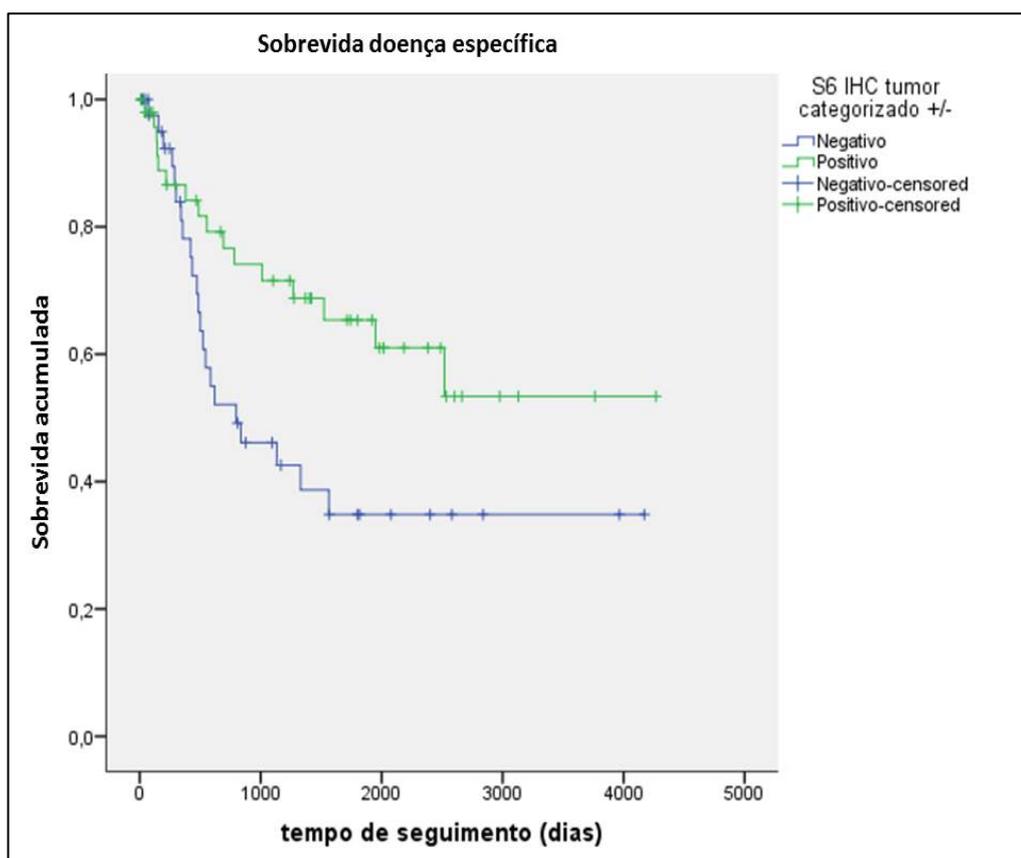


Figura 23 - Curva de sobrevivida doença específica pela análise de Kaplan Meyer avaliando o impacto da expressão de phosS6 na coorte de estudo.

5 DISCUSSÃO

Este estudo validou o valor prognóstico protetor de pS6 na sobrevida doença específica de pacientes operados por cistectomia, de maneira independente de outros fatores clínicos e patológicos classicamente impactantes no prognóstico (Tabela 9; Figura 23). Diante dos dados experimentais, que sugerem que a inibição de mTOR possa reduzir a progressão do câncer de bexiga (MANSURE et al. 2009; LEI et al. 2009; PARADA et al. 2011; MAKHLIN et al. 2011), esperar-se-ia que a maior expressão de pS6 determinasse um pior prognóstico.

Uma possível explicação para esta observação seria a regulação por retroalimentação negativa de vias que interagem com mTOR, potencialmente predominantes no carcinoma de bexiga, como a via induzida por hipóxia e a via MAPK. Nossos resultados sugerem, contudo, que a via induzida por hipóxia não exerça efeito inibitório sobre os níveis de expressão proteica e gênica de componentes da via mTOR. Outra hipótese plausível seria que a atividade de mTOR possa ser controlada em nível pós-transcricional, sendo que a sua expressão aumentada não necessariamente corresponderia à progressão do ciclo celular (GINGRAS et al. 2001). Estudos experimentais clássicos (NEUFELD et al. 1998; MONTAGNE et al. 1999) demonstram que a via mTOR interage com o ciclo celular na regulação do crescimento, através de S6K, porém seu bloqueio não causa redução no número de células, mas sim do tamanho das mesmas. Esta observação sugere que a via regule o crescimento celular de forma autônoma, sem limitar a proliferação. Uma terceira possibilidade supõe que a manutenção de outras funções da via mTOR distintas do crescimento e proliferação,

como sua participação no processo de diferenciação celular, possam conferir às células cancerígenas um fenótipo associado a prognóstico mais favorável. Em especial, ressalta-se o papel da via na transição epitélio-mesenquimal e diferenciação de células do sistema imune inato e adaptativo, que parece responder diretamente a estímulos do microambiente imune. Tais estímulos incluem receptores de células T (TCR), interleucinas e moléculas co-estimulatórias CD28 (*cluster of differentiation 28*) (SOLIMAN 2013). Finalmente, baseado na observação de que amostras neoplásicas mostraram níveis reduzidos de expressão proteica e gênica dos componentes da via mTOR em relação às amostras não-neoplásicas, admite-se supor que tumores de melhor prognóstico não elicitam inibição tão intensa de mTOR, embora possam apresentar algum grau de hiporregulação. Nesta linha, justificam-se os efeitos benéficos de inibidores de mTOR e, eventualmente, a resistência em tumores mais agressivos. (PINTO-LEITE et al. 2012)

Em um estudo em carcinomas uroteliais não músculo-invasivos (pTa e pT1) de pacientes tratados por RTU, foram observados menores índices de recorrência e de progressão para doença músculo-invasiva em tumores com níveis elevados de phosS6 (CHAUX et al. 2013). A ativação da via mTOR foi vista na maior parte dos tumores, sendo que o alto nível de PTEN mostrou-se um fator preditor independente de sobrevida livre de recorrência, progressão e metástase (RR = 3.0). De maneira semelhante, reconhece-se que a mutação de *FGFR* ou *PIK3CA* exerce efeito prognóstico protetor em carcinomas não músculo-invasivos (VAN RHIJN et al. 2010), possivelmente por refletirem oncogênese através da via não músculo-invasiva do carcinoma urotelial.

Na coorte do presente estudo, representada por pacientes submetidos a cistectomia, a expressão difusa (100%) de phosS6 foi vista em metade das amostras

periféricas e em apenas 1 amostra tumoral. Já a perda completa da expressão de phosS6 ocorreu em 18/68 amostras periféricas e 44/95 amostras tumorais, porém nenhuma correspondeu a tumor não músculo-invasivo. A perda menos acentuada, representada pela expressão em valores acima do ponto de corte, foi pouco frequente, porém exclusiva de tumores músculo-invasivos. Assim, conclui-se que a perda da expressão de phosS6 é característica do processo oncogênico do carcinoma urotelial, porém tumores não músculo-invasivos mantêm níveis mínimos de expressão da proteína.

AFONSO et al. (2014) estudaram a expressão de phos-mTOR em uma coorte semelhante à do presente estudo, tendo identificado positividade para o marcador em 36% das amostras de urotélio benigno e 20% das amostras neoplásicas. Curiosamente, à semelhança do que aqui se ilustrou quanto à expressão de phosAKT e phosS6 (Figuras 11 e 12), os autores relatam que a expressão de phos-mTOR predominou nas porções mais superficiais do urotélio (*umbrella cells*) e, nos tumores, observou-se perda da intensidade nas células mais profundas. A expressão do marcador foi inversamente proporcional ao estadiamento, havendo perda completa na maioria dos carcinomas músculo-invasivos. Em concordância, estudos experimentais demonstram que o efeito anti-proliferativo do inibidor da via mTOR é significativo em células cultivadas de tumores superficiais (5637), enquanto que a linhagem músculo-invasiva (T24) mostrou resistência acentuada (PINTO-LEITE et al. 2012).

Em carcinomas gástricos, a expressão positiva de p70S6K e phos-mTOR em carcinomas invasivos também mostrou efeito protetor na sobrevida doença específica (XIAO et al. 2009). A expressão de p70S6K foi positiva na grande maioria (>75%) das amostras não neoplásicas e adenomas, mostrando-se reduzida nas amostras de neoplasia invasiva, sendo que, neste subgrupo, foi expresso preferencialmente em pacientes mais

idosos e com tumores de morfologia bem diferenciada (tipo intestinal). A expressão positiva de phos-mTOR também associa-se a colangiocarcinomas bem diferenciados e adenocarcinomas pulmonares de estadiamento precoce (ANAGNOSTOU et al. 2009; LEE et al. 2012). Em tecidos prostáticos, a expressão de phos-mTOR mostrou-se reduzida nas amostras tumorais em relação ao epitélio não neoplásico e a perda da expressão correlacionou-se com características clinico-patológicas adversas (MÜLLER et al. 2013). Nesse cenário, a expressão de phos-mTOR constituiu-se como preditor de recorrência bioquímica precoce, inclusive de maneira independente do grau de Gleason e do estadiamento patológico.

Assim, é provável que a expressão constitutiva de mTOR seja necessária para atividades metabólicas normais do urotélio e de outros tipos celulares (GIBBONS et al. 2009) e que a manutenção da sua ativação, ainda que parcial, seja um fator prognóstico favorável em alguns tipos de câncer. O conjunto das informações pode refletir mecanismos alternativos de sinalização, distintos da via canônica de ativação através de *PI3K/PTEN*, que possivelmente relacionam-se à diferenciação celular.

De fato, a partir da análise de expressão de miRNAs, o presente estudo identificou um subgrupo de pacientes com tumores de morfologia bem diferenciada, onde predominaram aqueles com maior expressão de phosS6 (Figura 19, Tabela 9). Este subgrupo apresentou maior proporção de mulheres e histologia associada à via oncogênica não músculo-invasivo (tumores papilíferos no contexto de doença multifocal), o que refletiu em uma melhor sobrevida doença específica, apesar da maior frequência de idosos e do perfil de hiporregulação do conjunto de miRNAs diferencialmente expressos. Nos demais pacientes, observou-se patologia agressiva e epidemiologia mais próxima da média da coorte (predomínio da população masculina e

de tumores não-papilíferos com frequente diferenciação escamosa). O estadiamento patológico categorizado foi diferente nestas populações, especialmente quanto à distribuição de doença não músculo-invasivo vs. pT2, porém a categorização do estadiamento em tumores confinado ao órgão e não confinado ao órgão não foi significativamente diferente.

De maneira geral, o *cluster* I apresentou um perfil de hiper-regulação dos miRNAs e o *cluster* III de hiporregulação, sendo que o *cluster* II mostrou comportamento intermediário. A maioria dos miRNAs diferencialmente expressos participam de processos de diferenciação celular, incluindo transição epitélio-mesenquimal (mir-29, mir-130, mir-330) e propriedades de replicação/diferenciação em células não-especializadas, do tipo *stem-cell like* (mir-320, mir-328) (DONG et al. 2013; HSIEH et al. 2013; ROSENBERG et al. 2013; LI et al. 2014; YE et al. 2015). Curiosamente, entre os genes alvo associados a esses miRNAs, muitos estão envolvidos direta ou indiretamente na via mTOR, como mir-382 (*PTEN/HIF1*), mir-491 (*TP53/mTORC2*), mir-320, mir-493 e mir-330 (*E2F1*), mir-145 (*EGFR*), mir-125 (*TP53/HER2*) e mir-138 (*PDK1*) (CHO et al. 2011; GUO et al. 2012; FASSAN et al. 2013; GASPARINI et al. 2014; GU et al. 2014; LEE et al. 2009; GUO et al. 2014; LEOTTA et al. 2014; SEOK et al. 2014; YIN et al. 2014; YE et al. 2015; ZHENG et al. 2015).

Assim, nossos resultados sugerem que a regulação epigenética da via mTOR por miRNAs seja importante no carcinoma urotelial e, possivelmente, o perfil de hiporregulação de alguns deles relaciona-se à manutenção da ativação da via em tumores mais bem diferenciados. O conjunto das observações indica que alguns tumores com alta expressão de phosS6 permanecem bem diferenciados, apresentando uma melhor

sobrevida. Estas observações permitem assumir a possibilidade de que a via mTOR tenha um papel importante no desenvolvimento neoplásico, em detrimento da progressão da doença.

LEE et al. (2002) apoiam essa hipótese ao demonstrar que não há diferença na expressão de phosAKT entre tumores primários e metástases correspondentes, em carcinomas não-pequenas células do pulmão. Ademais, vários estudos comprovam que a expressão positiva de phosAKT associa-se à histologias bem diferenciadas do carcinoma de pulmão, em especial com morfologia bronquíolo-alveolar e estadiamento precoce (LEE et al. 2002; MUKOHARA et al. 2003; CAPPUZZO et al. 2004; SHAH et al. 2005).

A expressão de phosAKT ou *AKT1* não mostraram valor prognóstico na sobrevida dos pacientes da nossa coorte (Tabela 8), apesar de apresentarem boa correlação com a expressão de phosS6 ($r=0,30$, $p=0,034$ e $r= -0,43$, $p=0,015$ [vide anexos], respectivamente); vale notar que a relação entre as expressões dessas proteínas mostrou-se a mais robusta pela análise dendrológica (Figura 16). De maneira similar à expressão de phosS6, as amostras tumorais apresentaram níveis mais baixos de phosAKT em comparação com as periféricas, bem como expressão preferencial desses marcadores nas camadas celulares de situação superficial (Figuras 11 e 12), reforçando a possível relação com o processo de diferenciação urotelial. Uma vez que níveis mais altos de phosAKT e phosS6 relacionaram-se à redução da expressão de *AKT1*, é possível ainda que a expressão quantitativa dessas proteínas participe do controle transcricional da via mTOR, eventualmente por mecanismo de retroalimentação negativa.

Outros estudos em carcinoma urotelial discordam dessas observações; a maior parte das séries, contudo, aborda coortes restritas (WU et al. 2004; QIAN et al. 2009). O maior estudo (HARRIS et al. 2008) analisou 251 carcinomas uroteliais e relatou maior expressão de phosAKT em tumores em relação ao urotélio controle, porém o ponto de corte utilizado (intensidade intermediária ou forte) categorizou 5-6% das amostras como “alta expressão”.

Uma função reconhecida de *AKT1* é a manutenção da sobrevivência celular e inibição da apoptose. Há evidências, contudo, que esta via também esteja envolvida na promoção de morte celular, por mecanismos que envolvam redução da fração de fase-S e inibição do ciclo através de p21, que é constitutivamente ativado por *AKT1* (LAWLOR e ROTWEIN 2000; PEREZ-TENORIO e STAL 2002). Em concordância, demonstrou-se experimentalmente que a rapamicina, inibidor da via mTOR, pode sensibilizar as células para apoptose mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) através da ativação de *AKT1*, em retroalimentação negativa (NOGUEIRA et al. 2008). Em cultura de células de adenocarcinoma pulmonar tratadas com IGF-I, um potente agente pró-mitótico, observou-se inibição do crescimento mediado pela ativação sustentada de *AKT1* (KODAMA et al. 2002). Finalmente, em pacientes com carcinoma endometrial, a expressão elevada de phosAKT associou-se a melhor sobrevida doença específica (MORI et al. 2007). Assim, conclui-se que *AKT1* tem um papel central na regulação do ciclo celular, envolvendo tanto a sobrevida como a morte celular, sendo possível que a ativação da expressão gênica e/ou proteica possa variar de acordo com os estímulos do microambiente ou de maneira órgão(ou tumor)-específica.

Apesar de ensaios pré-clínicos promissores, estudos clínicos utilizando inibidores de mTOR em pacientes com câncer de bexiga mostram resultados modestos.

Contudo, ressalta-se que foram conduzidos em pacientes com falha terapêutica e sem critérios de seleção bem definidos. Ressalta-se que as coortes de pacientes submetidos a cistectomia têm alta proporção de carcinomas músculo-invasivos, os quais alguns evoluíram diretamente pela via CIS/músculo-invasiva e outros são frutos de progressão a partir da via não músculo-invasivo. Estes, porém, nem sempre tiveram a oportunidade do diagnóstico precoce, e muitas vezes apresentam-se já com doença músculo-invasiva. Nesse sentido, a observação de quimiorresistência a inibidores de mTOR, em pacientes cujos tumores uroteliais mostram perda da expressão de PTEN (SERONT et al. 2012), é consistente com nossas observações, visto que a perda de PTEN é um evento associado à via músculo-invasiva de oncogênese, na qual a expressão dos componentes da via mTOR mostrou-se globalmente reduzida no nosso estudo.

Analogamente, em culturas celulares de carcinoma não-pequenas células do pulmão, altos níveis de phosAKT conferem quimiorresistência (BROGNARD et al. 2001). A combinação de inibidores da via PI3K/AKT à quimioterapia convencional atenua esse comportamento, sugerindo que a inibição direta de phosAKT possa ser uma estratégia eficiente para melhorar a resposta. Em pacientes com tumores primários de outros órgãos, porém, como glioblastoma e carcinoma de células renais, a perda da expressão de PTEN ou ativação de AKT, bem como hiperexpressão de phosS6 e 4EBP-1, estiveram associados a uma melhor resposta (GALANIS et al. 2005; CHO et al. 2007).

Nossos resultados indicam uma correlação linear positiva robusta entre a expressão gênica de *PTEN* e *HIF1* (Figuras 7 e 8), que manteve-se com menos intensidade na análise de expressão proteica (Figuras 16 e 17). É interessante notar que a relação entre a expressão gênica de PTEN e a expressão protéica de HIF-1 α é

significante e negativa, sugerindo que o clássico mecanismo de aumento da expressão de HIF-1 α secundário à a perda funcional de *PTEN* está mantido nesses tumores. Analogamente, supõe-se que a elevação quantitativa de HIF-1 α exerce efeito inibitório na transcrição de *HIF1*, o que justificaria a positividade da correlação entre a expressão dos dois genes, apoiando a sugestão de que os mecanismos de retroalimentação entre a via mTOR e a via induzida por hipóxia estejam preservados e ativos em tumores uroteliais. Uma vez que PTEN e HIF1 α não se correlacionaram na análise dendrológica da expressão de amostras periféricas benignas (Figura 15), conclui-se que a associação HIF-PTEN, que possivelmente reflete a interação entre a via mTOR e a via induzida por hipóxia, é característica do processo neoplásico em bexiga.

A análise dendrológica mostrou que as vias mTOR e induzida por hipóxia operam de maneira independente em níveis fisiológicos, classificando-as de maneira isolada (Figura 15). A via induzida por hipóxia mostrou-se próxima do ciclo celular em situação fisiológica, enquanto o conjunto mTOR mostrou-se pouco relacionado. Em contrapartida, na análise de expressão proteica de amostras malignas, a associação HIF1 α -PTEN aproximou a via induzida por hipóxia da via mTOR, desfazendo a sua relação com o ciclo celular (Figura 16). Isso ficou mais evidente na análise de expressão gênica, em que *HIF1* esteve inserido entre *PTEN* e *RPS6* (Figura 7), reforçando a hipótese de que a associação HIF-PTEN relaciona-se à oncogênese urotelial.

Uma possibilidade, respaldada pelos nossos achados, é que tumores que preservam PTEN mantém a via mTOR viável (embora expressa em níveis basais), permitindo a tradução de proteínas como HIF1 α e VEGF. De fato, no presente estudo, pacientes cujos tumores apresentaram expressão positiva de HIF1 α e VEGF tiveram uma melhor sobrevida, comparados a pacientes com perda da expressão dessas

proteínas. Nesse contexto, admite-se a participação de outras vias ativadoras de mTOR, alternativas à clássica ativação de *PIK3CA* mediada pela perda do efeito inibitório de *PTEN* mutado. Assumindo-se que o microambiente tumoral é hipóxico por definição, e que a expressão de HIF1 α e VEGF ocorre em resposta a baixos níveis de oxigenação, postula-se que tumores com perda da expressão dessas proteínas correspondam a um fenótipo aberrante, hipóxia-resistente, o que seria consistente com alterações das vias normais de tradução protéica.

Em pacientes com colangiocarcinomas, LEE et al. (2012) também não observaram associação entre a perda da expressão de PTEN e aumento da expressão de phosAKT ou de outras proteínas relacionadas à via mTOR. Em carcinomas endometriais, altos níveis de phosAKT ocorreram independentemente de mutações em *PTEN* e *PI3K* (VELASCO et al. 2006; MORI et al. 2007). Ademais, um estudo envolvendo mais de 600 pacientes com carcinomas mamários demonstrou associação positiva entre a expressão de PTEN e phosAKT (PANIGRAHI et al. 2004). Esses achados corroboram a hipótese de que mutações em *PTEN* ou perda da expressão de PTEN não levam necessariamente à ativação do eixo AKT/mTOR. Em concordância, nossos achados indicam que, exceto pelos efeitos a montante, possivelmente relacionados a *PTEN*, o modelo *AKT1-MTOR-RPS6* permanece funcionando, pelo menos em grande parte dos carcinomas uroteliais incluídos na coorte de estudo.

Uma vez que não há evidências de que a via induzida por hipóxia seja responsável pelos baixos níveis de phosS6 em carcinomas uroteliais mais agressivos, que a perda de PTEN também não parece estar implicada neste fenômeno, e que a ativação da via mTOR relaciona-se a tumores mais bem diferenciados, este estudo conclui que o impacto prognóstico favorável de phosS6 é um reflexo da manutenção de

outras funções da via mTOR, distintas da proliferação e crescimento, possivelmente relacionada a diferenciação celular. Nesse cenário, é possível que fatores epigenéticos estejam intrinsecamente envolvidos, através da regulação de miRNAs, interação com o estroma e transição epitélio-mesenquimal e/ou com a resposta imune do hospedeiro. Estas observações são consistentes com o modelo atual do carcinoma urotelial, que reconhece subtipos moleculares relacionados a diferenciação do tipo basal e luminal. (LINDGREN et al. 2012; CHOI et al. 2014b; Cancer Genome Atlas Research Network 2014), associados a diferenças morfológicas, prognósticas e de resposta terapêutica a esquemas terapêuticos direcionados. Considerando que neoplasias do tipo luminal correspondem a carcinomas mais diferenciados e que este subgrupo representa a maior parcela dos tumores de bexiga resistentes à cisplatina, nossos resultados sugerem que a terapia alvo com inibidores de mTOR pode ser mais eficiente nestes pacientes.

6 CONCLUSÕES

- A perda da expressão de pS6 ocorre gradualmente no eixo benigno - carcinoma não músculo-invasivo - carcinoma invasivo.
- Não há evidências de que a via induzida por hipóxia ou a perda de PTEN estejam implicadas diretamente nesse fenômeno.
- É possível que fatores epigenéticos estejam envolvidos, através da regulação de miRNAs. Foi identificado um conjunto de 17 miRNAs preferencialmente hiporregulados (cujos genes alvo participam direta ou indiretamente da via mTOR), associados a um prognóstico favorável.
- A expressão de pS6 tem valor prognóstico independente na sobrevida doença específica em pacientes operados por cistectomia.
- O impacto favorável de pS6 na sobrevida pode refletir a manutenção de outras funções da via mTOR, distintas da proliferação e crescimento, possivelmente relacionadas à diferenciação celular.
- Estas observações são consistentes com o modelo atual do carcinoma urotelial, que reconhece subtipos moleculares relacionados a diferenciação (basal e luminal), com diferenças prognósticas e de resposta terapêutica.
- Nossos resultados sugerem que esquemas quimioterápicos baseados em inibidores de mTOR possam ser mais eficientes em neoplasias do tipo luminal, uma vez que correspondem a carcinomas mais diferenciados, nos quais a resistência à cisplatina é maior.

7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam L, Zhong M, Choi W, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. **Clin Cancer Res** 2009; 15:5060-72.

Afonso J, Longatto-Filho A, DA Silva VM, Amaro T, Santos LL. Phospho-mTOR in non-tumour and tumour bladder urothelium: Pattern of expression and impact on urothelial bladder cancer patients. **Oncol Lett** 2014; 8:1447-1454.

Amim MB, Delahunt B, Bochner BH, editors. **American Joint Committee on Cancer (AJCC)**. 7th ed. New York: Springer Verlag; 2010. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the urinary bladder; Genitourinary, 3.2.0.0.

Anagnostou VK, Gerold Bepler G, Syrigos KN, et al. High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:4157-64.

Aveyard JS, Skilleter A, Habuchi T, Knowles MA. Somatic mutation of PTEN in bladder carcinoma. **Br J Cancer** 1999; 80:904-8.

Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF, Gehrig PA. Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells. **Cancer** 2009; 115:3887-96.

Bamias A, Tiliakos I, Karali MD, Dimopoulos MA. Systemic chemotherapy in inoperable or metastatic bladder cancer. **Ann Oncol** 2006; 17:553-61.

Brognard J, Clark AS, Ni YC, Dennis PA. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. **Cancer Res** 2001; 61:3986-97.

Campos A, Silva A, Mota L, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the AC Camargo hospital. **Biopreserv Biobank** 2012; 10:168-73.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. **Nature** 2014; 507:315-22.

Cantley LC. The Phosphoinositide 3-Kinase pathway. **Science** 2002; 296:1655-7.

Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 2004; 96:1133-41.

Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. **Urol Oncol** 2010; 28:401-8.

Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:2903-10.

Catto JW, Miah S, Owen HC, et al. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. **Cancer Res** 2009; 69:8472-81.

Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:127-50.

Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:1007-13.

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

Chen M, Cassidy A, Gu J, et al. Genetic variations in PI3K-AKT-mTOR pathway and bladder cancer risk. **Carcinogenesis** 2009; 30:2047-52.

Cho D, Signoretti S, Dabora S, et al. Potential histologic and molecular predictors of response to temsirolimus in patients with advanced renal cell carcinoma. **Clin Genitour Cancer** 2007; 5:379-85.

Cho WC, Chow AS, Au JS. MiR-145 inhibits cell proliferation of human lung adenocarcinoma by targeting EGFR and NUDT1. **RNA Biol** 2011; 8:125-31.

Choi W, Porten S, Kim S, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. **Cancer Cell** 2014a; 25:152-65.

Choi W, Czerniak B, Ochoa A, et al. Intrinsic basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer. **Nat Rev Urol** 2014b; 11:400-10.

Corradi CE, Campos G, Nogueira L, et al. **Diretrizes no tratamento do câncer urológico da Sociedade Brasileira de Urologia**. São Paulo: Planmark Editora; 2009.

Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2008; 218:154-65.

Dalbagni G, Presti JC, Jr, Reuter VE, et al. Molecular genetic alterations of chromosome 17 and p53 nuclear overexpression in human bladder cancer. **Diagn Mol Pathol** 1993; 2:4-13.

Dip N, Reis ST, Timoszczuk LS, et al. Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile. **J Urol** 2012; 188:1951-6.

Dong P, Karaayvaz M, Jia N, et al. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. **Oncogene** 2013; 32:3286-95.

Dyrskjøt L, Ostensfeld MS, Bramsen JB, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. **Cancer Res** 2009; 69:4851-60.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Urinary bladder; p.497-502.

Fassan M, Pizzi M, Realdon S, et al. The HER2-miR125a5p/miR125b loop in gastric and esophageal carcinogenesis. **Hum Pathol** 2013; 44:1804-10.

Fendler A, Stephan C, Yousef GM, Jung K. MicroRNAs as Regulators of Signal Transduction in Urological Tumors. **Clin Chem** 2011; 57:954-68.

Flaherty KT, Puzanov I. Building on a foundation of VEGF and mTOR targeted agents in renal cell carcinoma. **Biochem Pharmacol** 2010; 80:638-46.

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:2237-46.

Fumarola C, La Monica S, Alfieri RR, Borra E, Guidotti GG. Cell size reduction induced by inhibition of the mTOR/S6K-signaling pathway protects Jurkat cells from apoptosis. **Cell Death Differ** 2005; 12:1344-57.

Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. **J Clin Oncol** 2005; 23:5294-304.

Gallagher DJ, Milowsky MI, Gerst SR, et al. Phase II study of sunitinib in patients with metastatic urothelial cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:1373-9.

Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. **Am J Physiol Cell Physiol** 2004; 287:C281-91.

Garcia del Muro X, Condom E, Vignes F, et al. p53 and p21 expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. **Cancer** 2004; 100:1859-67.

Gasparini P, Cascione L, Fassan M, et al. microRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. **Oncotarget** 2014; 5:1174-84.

Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. **Semin Oncol** 2009; 36:S3-S17.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev** 2001; 15:807-26.

Green DA, Rink M, Hansen J, et al. Accurate preoperative prediction of non-organ-confined bladder urothelial carcinoma at cystectomy. **BJU Int** 2013; 111:404-11.

Gressner AM, Wool IG. The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. **J Biol Chem** 1974; 249:6917-25.

Gu Y, Cheng Y, Song Y, et al. MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1. **PLoS One** 2014; 9:e102602.

Gui Y, Guo G, Huang Y, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. **Nat Genet** 2011; 43:875-8.

Guo G, Sun X, Chen C, et al. Whole-genome and whole-exome sequencing of bladder cancer identifies frequent alterations in genes involved in sister chromatid cohesion and segregation. **Nat Genet** 2013; 45:1459-63.

Guo R, Wang Y, Shi WY, Liu B, Hou SQ, Liu L. MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. **Molecules** 2012; 17:14733-47.

Guo YH, Zhang C, Shi J, et al. Abnormal activation of the EGFR signaling pathway mediates the downregulation of miR 145 through the ERK1/2 in non-small cell lung cancer. **Oncol Rep** 2014; 31:1940-6.

Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. **J Cell Biol** 2004; 166:213-23.

Harris LD, De La Cerda J, Tuziak T, et al. Analysis of the expression of biomarkers in urinary bladder cancer using a tissue microarray. **Mol Carcinog** 2008; 47:678-85.

Hay N. The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. **Cancer Cell** 2005; 8:179-83.

Herr HW, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guerin refractory superficial bladder tumors. **J Urol** 2003; 169:1706-8.

Hornberger TA, Sukhija KB, Wang XR, Chien S. mTOR is the rapamycin-sensitive kinase that confers mechanically-induced phosphorylation of the hydrophobic motif site Thr(389) in p70(S6k). **FEBS Lett** 2007; 581:4562-6.

Houédé N, Pourquier P. Targeting the genetic alterations of the PI3K–AKT–mTOR pathway: Its potential use in the treatment of bladder cancers. **Pharmacol Ther** 2015; 145:1-18.

Hsieh IS, Chang KC, Tsai YT, et al. MicroRNA-320 suppresses the stem cell-like characteristics of prostate cancer cells by downregulating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Carcinogenesis** 2013; 34:530-8.

Hwang M, Perez CA, Moretti L, Lu B. The mTOR signaling network: insights from its role during embryonic development. **Curr Med Chem** 2008; 15:1192-208.

Inoki K, Li Y, Xu T, Guan KL. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. **Genes Dev** 2003; 17:1829-34.

Iyer G, Hanrahan AJ, Milowsky MI, et al. Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. **Science** 2012; 338:221.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** 2007; 57:43-66.

Kim JJ. Recent advances in treatment of advanced urothelial carcinoma. **Curr Urol Rep** 2012; 13:147-52.

Kodama Y, Baxter RC, Martin JL. Insulin-like growth factor-I inhibits cell growth in the a 549 non-small lung cancer cell line. **Am J Respir Cell Mol Biol** 2002; 27:336-44.

Korkolopoulou P, Levidou G, Trigka EA, et al. A comprehensive immunohistochemical and molecular approach to the PI3K/AKT/mTOR (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene/mammalian target of rapamycin) pathway in bladder urothelial carcinoma. **BJU Int** 2012; 110:E1237-48.

Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. **Clin Cancer Res** 2006; 12:2780-7.

Lawlor MA, Rotwein P. Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. **Mol Cell Biol** 2000; 20:8983-95.

Lee D, Do I, Choi K, et al. The expression of phospho-AKT1 and phospho-MTOR is associated with a favorable prognosis independent of PTEN expression in intrahepatic cholangiocarcinomas. **Mod Pathol** 2012; 25:131-9.

Lee KH, Chen YL, Yeh SD, et al. MicroRNA-330 acts as tumor suppressor and induces apoptosis of prostate cancer cells through E2F1-mediated suppression of Akt phosphorylation. **Oncogene** 2009; 28:3360-70.

Lee SH, Kim HS, Park WS, et al. Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. **APMIS** 2002; 110:587-92.

Lei W, Jia T, Su Z, Wen W, Zhu X. Combined effect of rapamycin and cisplatin on survival of Hep-2 cells in vitro. **Oncol Res** 2009; 18:73-81.

Leotta M, Biamonte L, Raimondi L, et al. A p53-dependent tumor suppressor network is induced by selective miR-125a-5p inhibition in multiple myeloma cells. **J Cell Physiol** 2014; 229:2106-16.

Li M, Li H, Liu X, Xu D, Wang F. MicroRNA-29b regulates TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells by targeting AKT2. **Exp Cell Res** 2014 Sep 28. [Epub ahead of print]

Lin J, Dinney CP, Grossman HB, et al. E-cadherin promoter polymorphism (C-160A) and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. **Clin Genet** 2006; 70:240-5.

Lin CC, Hsu CH, Pu YS, Vogelzang NJ. Systemic therapy for metastatic urothelial carcinoma. **BJU Int** 2008; 101:795-803.

Lindgren D, Sjö Dahl G, Lauss M, et al. Integrated genomic and gene expression profiling identifies two major genomic circuits in urothelial carcinoma. **PLoS One** 2012; 7:e38863.

Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. **Mol Cell** 2006; 21:521-31.

Liu Y, Han Y, Zhang H, et al. Synthetic miRNA-Mowers Targeting miR-183-96-182 Cluster or miR-210 Inhibit Growth and Migration and Induce Apoptosis in Bladder Cancer Cells. **PLoS One** 2012; 7:e52280.

Lopez-Beltran A, Montironi R. Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification. **Eur Urol** 2004; 46:170-6.

Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:307-18.

Makhlin I, Zhang J, Long CJ, et al. The mTOR pathway affects proliferation and chemosensitivity of urothelial carcinoma cells and is upregulated in a subset of human bladder cancers. **BJU Int** 2011; 108:E84-90.

Maluf FC, Cordon-Cardo C, Verbel DA, et al. Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. **Ann Oncol** 2006; 17:1677-86.

Manning BD, Cantley LC. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. **Trends Biochem Sci** 2003; 28:573-6.

Mansure JJ, Nassim R, Chevalier S, Rocha J, Scarlata E, Kassouf W. Inhibition of mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy in the management of bladder cancer. **Cancer Biol Ther** 2009; 8:2339-47.

Martin FM, Kamat AM. Definition and management of patients with bladder cancer who fail BCG therapy. **Expert Rev Anticancer Ther** 2009; 9:815-20.

Martin PM, Sutherland AE. Exogenous amino acids regulate trophoecto-derm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. **Dev Biol** 2001; 240:182-93.

McConkey DJ, Dinney CP. The molecular, the bad, and the ugly: preventing bladder cancer via mTOR inhibition. **Cancer Prev Res (Phila)** 2009; 2:1001-2.

McConkey DJ, Choi W, Ochoa A, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP. Therapeutic opportunities in the intrinsic subtypes of muscle-invasive bladder cancer. **Hematol Oncol Clin North Am** 2015; 29:377-94.

Mehrsai A, Mansoori D, Taheri Mahmoudi M, Sina A, Seraji A, Pourmand GH. A comparison between clinical and pathologic staging in patients with bladder cancer. **Urol J** 2004; 1:85-9.

Mhaweck-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review. **Cancer** 2006; 106:1205-16.

Miyazawa M, Yasuda M, Fujita M, et al. Therapeutic strategy targeting the mTOR-HIF-1 α -VEGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. **Pathol Int** 2009; 59:19-27.

Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G. Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. **Science** 1999; 285:2126-9.

Morais DR, Reis ST, Viana N, et al. The involvement of miR-100 in bladder urothelial carcinogenesis changing the expression levels of mRNA and proteins of genes related to cell proliferation, survival, apoptosis and chromosomal stability. **Cancer Cell Int** 2014; 14:119-127.

Mori N, Kyo S, Sakaguchi J, et al. Concomitant activation of AKT with extracellular regulated kinase 1/2 occurs independently of PTEN or PIK3CA mutations in endometrial cancer and may be associated with favorable prognosis. **Cancer Sci** 2007; 98:1881-8.

Mukohara T, Kudoh S, Yamauchi S, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Lung Cancer** 2003; 41:123-30.

Müller J, Ehlers A, Burkhardt L, et al. Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. **Int J Cancer** 2013; 132:1333-40.

Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10314-9.

Neufeld TP, de la Cruz AF, Johnston LA, Edgar BA. Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. **Cell** 1998; 93:1183-93.

Nogueira V, Park Y, Chen CC, et al. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. **Cancer Cell** 2008; 14:458-70.

Nordentoft I, Birkenkamp-Demtroder K, Agerbæk M, et al. miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer. **BMC Med Genomics** 2012; 5:40.

O'Donnell MA. Advances in the management of superficial bladder cancer. **Semin Oncol** 2007; 34:85-97.

Olivieri EH, Franco LA, Pereira RG, Mota LD, Campos AH, Carraro DM. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreserv Biobank** 2014; 12:46-52.

Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, et al. The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. **J Pathol** 2004; 204:93-100.

Pantuck AJ, Seligson DB, Klatter T, et al. Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma: implications for molecular patient selection for targeted therapy. **Cancer** 2007; 109:2257-67.

Parada B, Reis F, Figueiredo A, et al. Inhibition of bladder tumour growth by sirolimus in an experimental carcinogenesis model. **BJU Int** 2011; 107:135-43.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. **Nature** 1994; 27:762-7.

Perez-Tenorio G, Stal O. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. **Br J Cancer** 2002; 86:540-5.

Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, et al. MicroRNA expression profile in a large series of bladder tumors: Identification of a 3-mirna signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. **Int J Cancer** 2013; 132:2479-91.

Ping SY, Wu CL, Yu DS. Sunitinib can enhance BCG mediated cytotoxicity to transitional cell carcinoma through apoptosis pathway **Urol Oncol** 2012; 30:652-9.

Pinto-Leite R, Arantes-Rodrigues R, Palmeira C, et al. Everolimus enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in bladder-cancer cell lines. **J Toxicol Environ Health A** 2012; 75:788-99.

Podsypanina K, Lee RT, Politis C, et al. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten^{+/-} mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10320-5.

Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. **Int J Mol Sci** 2012; 13:1886-918.

Puzio-Kuter AM, Castillo-Martin M, Kinkade CW, et al. Inactivation of p53 and Pten promotes invasive bladder cancer. **Genes Dev** 2009; 26:675-80.

Qian CN, Furge KA, Knol J, et al. Activation of the PI3K/Akt pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models. **Cancer Res** 2009; 69:8256-64.

Reuter VE. The pathology of bladder cancer. **Urology** 2006; 67:11-7; discussion 17-8.

Rosenberg E, Baniel J, Spector Y, et al. Predicting progression of bladder urothelial carcinoma using microRNA expression. **BJU Int** 2013; 112:1027-34.

Saklad M. Grading of patients for surgical procedures. **Anesthesiology** 1941; 2:281-4.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. **Mol Cell** 200; 25:903-15.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science** 2005; 307:1098-101.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:53-9.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. **J Urol** 1994; 152:388-92.

Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, et al. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. **J Clin Oncol** 1995; 13:1384-90.

Schultz L, Albadine R, Hicks J, et al. Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy. **Cancer** 2010; 116:5517-26.

Schultz L, Chaux A, Albadine R, et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2011; 10:1549-56.

Seager CM, Puzio-Kuter AM, Patel T, et al. Intravesical delivery of rapamycin suppresses tumorigenesis in a mouse model of progressive bladder cancer. **Cancer Prev Res (Phila)** 2009; 2:1008-14.

Seok JK, Lee SH, Kim MJ, Lee YM. MicroRNA-382 induced by HIF-1 α is an angiogenic miR targeting the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog. **Nucleic Acids Res** 2014; 42:8062-72.

Seront E, Rottey S, Sautois B, et al. Phase II study of everolimus in patients with locally advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelial tract: clinical activity, molecular response, and biomarkers. **Ann Oncol** 2012; 23:2663-70.

Shah A, Swain WA, Richardson D, Edwards J, Stewart DJ. Phospho-Akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2930-6.

Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. **J Urol** 2007; 177:481-7; discussion 487.

Sio TT, Ko J, Gudena VK, Verma N, Chaudhary UB. Chemotherapeutic and targeted biological agents for metastatic bladder cancer: a comprehensive review. **Int J Urol** 2014; 21:630-7.

Skacel M, Fahmy M, Brainard JA, et al. Multitarget fluorescence in situ hybridization assay detects transitional cell carcinoma in the majority of patients with bladder cancer and atypical or negative urine cytology. **J Urol** 2003; 169:2101-5.

Soliman GA. The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signaling in the immune responses. **Nutrients** 2013; 5:2231-57.

Soloway MS, Sofer M, Vaidya A. Contemporary management of stage T1 transitional cell carcinoma of the bladder. **J Urol** 2002; 167:1573-83.

Song T, Xia W, Shao N, et al. Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas. **Asian Pac J Cancer Prev** 2010; 11:905-11.

Sonpavde G, Jian W, Liu H, Wu MF, Shen SS, Lerner SP. Sunitinib malate is active against human urothelial carcinoma and enhances the activity of cisplatin in a preclinical model. **Urol Oncol** 2009; 27:391-9.

Steelman LS, Navolanic PM, Sokolosky ML, et al. Suppression of PTEN function increases breast cancer chemotherapeutic drug resistance while conferring sensitivity to mTOR inhibitors. **Oncogene** 2008a; 27: 4086-95.

Steelman LS, Stadelman KM, Chappell WH, et al. Akt as a therapeutic target in cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2008b; 12:1139-65.

Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, Groshen S, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. **J Clin Oncol** 2001; 19:666-75.

Sun CH1, Chang YH, Pan CC. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. **Histopathology** 2011; 58:1054-63.

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. **Eur Urol** 2006; 49:466-5; discussion 475-7.

Tickoo SK, Milowsky MI, Dhar N, et al. Hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin pathway markers in urothelial carcinoma of the bladder: possible therapeutic implications. **BJU Int** 2010; 107:844-9.

Tzai TS, Tsai YS, Chow NH. The prevalence and clinicopathologic correlate of p16INK4a, retinoblastoma and p53 immunoreactivity in locally advanced urinary bladder cancer. **Urol Oncol** 2004; 22:112-8.

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. **Nat Cell Biol** 2007; 9:316-23.

van Rhijn BW, Zuiverloon TC, Vis AN, et al. Molecular grade (FGFR3/MIB-1) and EORTC risk scores are predictive in primary non-muscle-invasive bladder cancer. **Eur Urol** 2010; 58:433-41.

Veerla S, Lindgren D, Kvist A, et al. MiRNA expression in urothelial carcinomas: important roles of miR-10a, miR-222, miR-125b, miR-7 and miR-452 for tumor stage and metastasis, and frequent homozygous losses of miR-31. **Int J Cancer** 2009; 124:2236-42.

Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, et al. PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. **Hum Pathol** 2006; 37:1465-72.

von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:4602-8.

Wang DS, Rieger-Christ K, Latini JM, et al. Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma. **Int J Cancer** 2000; 88:620-5.

Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. **Hum Mol Genet** 2013; 22:795-803.

Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:851-64.

Wu X, Obata T, Khan Q, et al. The phosphatidylinositol-3 kinase pathway regulates bladder cancer cell invasion. **BJU Int** 2004; 93:143-50.

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

Xiang X, Zhao J, Xu G, Li Y, Zhang W. mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta Biochim Biophys Sin** 2011, 43:501-10.

Xiao L, Wang YC, Li WS, Du Y. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical study on tissue microarray. **J Exp Clin Cancer Res** 2009; 28:152.

Xie HY, Zhu Y, Yao XD, et al. Development of a nomogram to predict non-organ-confined bladder urothelial cancer before radical cystectomy. **Int Urol Nephrol** 2012; 44:1711-9.

Xu C, Zeng Q, Xu W, et al. MicroRNA-100 inhibits human bladder urothelial carcinogenesis by directly targeting mTOR. **Mol Cancer Ther** 2013; 12:207-19.

Yates DR, Rehman I, Abbod MF, et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2046-53.

Ye XW, Yu H, Jin YK, et al. miR-138 inhibits proliferation by targeting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in non-small cell lung cancer cells. **Clin Respir J** 2015; 9:27-33.

Yin M, Wang X, Yao G, et al. Transactivation of microRNA-320 by microRNA-383 regulates granulosa cell functions by targeting E2F1 and SF-1 proteins. **J Biol Chem** 2014; 289:18239-57.

Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R, et al. Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: A prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. **Am J Clin Pathol** 2007; 127:295-301.

Yun SJ, Jeong P, Kim WT, et al. Cell-free microRNAs in urine as diagnostic and prognostic biomarkers of bladder cancer. **Int J Oncol** 2012; 41:1871-8.

Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. **Am J Pathol** 2007; 171:728-38.

Zheng G, Jia X, Peng C, et al. The miR-491-3p/mTORC2/FOXO1 regulatory loop modulates chemo-sensitivity in human tongue cancer. **Oncotarget** 2015 Feb 19. [Epub ahead of print]

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2011; 12:21-35.

Apêndice 1 - Distribuição das proteínas (expressão categorizada) que apresentaram associação significativa ($p < 0,05$) com o estadiamento cirúrgico.

Expressão proteica (imunohistoquímica) categorizada		Estadiamento Cirúrgico					
		Não músculo-invasivo		Invasivo órgão confinado		Invasivo não órgão- confinado	
		N (%)		N (%)		N (%)	
Caspase-3	< 1.8	9	(56)	17	(81)	47	(85)
	≥ 1.8	7	(44)	4	(19)	8	(15)
p53	Negativo	4	(21)	8	(36)	16	(29)
	Positivo	15	(79)	14	(64)	40	(71)
pRB	Negativo	1	(05)	2	(09)	17	(30)
	Positivo	18	(95)	20	(91)	39	(70)
Ciclina D1	Negativo	2	(11)	5	(23)	20	(36)
	< 1.8	3	(16)	5	(23)	23	(41)
	≥ 1.8	14	(74)	12	(55)	13	(23)
phosS6	Negativo	1	(08)	13	(59)	29	(51)
	< 22,5	11	(92)	7	(32)	22	(39)
	≥ 22,5	0	(0)	2	(9)	6	(11)
VEGF	Negativo	4	(31)	14	(64)	39	(68)
	Positivo	9	(69)	8	(36)	18	(32)

Superficial: pTa, pTis, pT1; Invasivo órgão confinado: pT2; Invasivo não-órgão confinado: pT3, pT4.

Apêndice 2- Correlação entre valores absolutos de expressão proteica e gênica, conforme pontos de corte adotados na metodologia do trabalho

		Ki67	caspase-3	p53	pRb	ciclina D1	PTEN	phosAKT	phosS6	HIF-1 α	VEGF
MKI67	c	-.061	-.048	-.040	-.227	-.146	-.200	-.064	-.089	-.102	-.036
	p	.628	.701	.748	.099	.243	.187	.596	.618	.425	.776
	N	65	66	66	54	66	45	72	34	63	64
CASP3	c	-.138	-.022	.323	-.098	-.161	.073	-.023	-.075	-.100	-.136
	p	.270	.861	.008	.480	.193	.632	.848	.684	.434	.283
	N	66	65	67	54	67	45	72	32	63	64
TP53	c	-.148	-.259	-.108	-.091	-.143	-.201	.085	.142	-.036	-.173
	p	.239	.037	.390	.498	.252	.175	.478	.422	.782	.171
	N	65	65	66	58	66	47	72	34	63	64
RBI	c	-.134	-.008	.133	-.011	-.154	-.039	.043	-.095	-.153	.010
	p	.282	.948	.284	.937	.214	.799	.718	.592	.223	.934
	N	66	67	67	56	67	46	72	34	65	66
PTEN	c	.198	-.066	.020	-.210	-.193	-.091	-.255	.088	-.229	-.305
	p	.117	.603	.874	.128	.124	.552	.031	.638	.074	.014
	N	64	64	65	54	65	45	72	31	62	64
AKT	c	.204	-.143	.024	-.248	-.262	-.009	-.272	-.242	-.176	-.128
	p	.115	.272	.856	.079	.040	.954	.025	.182	.183	.325
	N	61	61	62	51	62	41	68	32	59	61
MTOR	c	.307	.005	.044	-.131	-.308	-.025	-.265	.219	-.059	-.008
	p	.014	.966	.732	.353	.013	.874	.026	.221	.650	.951
	N	63	64	64	52	64	44	71	33	61	62
EIF4EBPI	c	.028	-.059	.046	-.233	-.047	-.057	-.105	-.151	.046	-.009
	p	.833	.654	.727	.107	.721	.726	.396	.434	.729	.945
	N	60	61	61	49	61	40	68	29	59	59
RPS6	c	.266	-.127	.012	-.076	-.141	-.066	-.258	.218	.082	-.050
	p	.032	.311	.923	.580	.257	.662	.028	.215	.523	.694
	N	65	66	66	55	66	46	72	34	63	64
HIF1A	c	.050	-.047	.079	-.076	-.125	-.061	-.175	.189	-.025	-.170
	p	.703	.721	.545	.595	.339	.700	.154	.310	.854	.193
	N	60	61	61	51	61	42	68	31	58	60

c= coeficiente de correlação de Spearman; p=valor de p (adotado <0,1). Em vermelho correlações positivas e em azul correlações negativas.

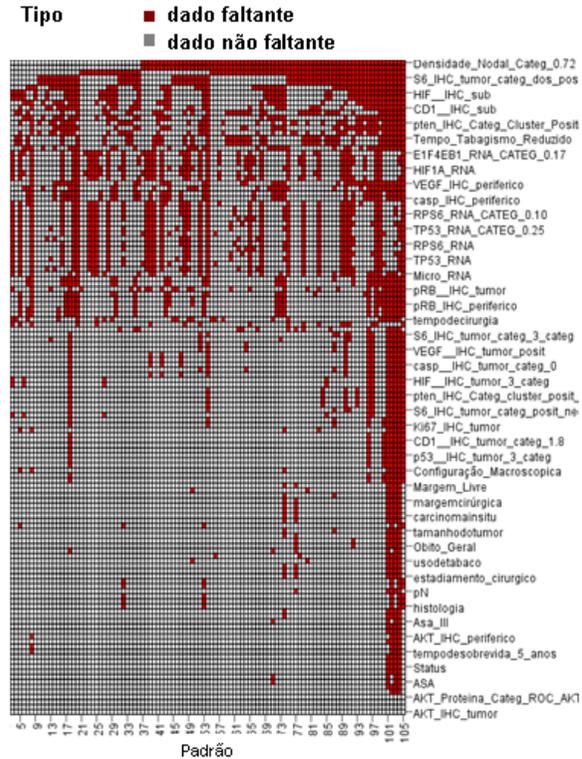
Apêndice 3- Análise canônica de dados faltantes (*missing*)

Sumário das variáveis com >30% de dados faltantes, considerando um banco de 106 pacientes (101 da coorte + 5 cujas amostras serviram como controle para as reações de RT-PCR)

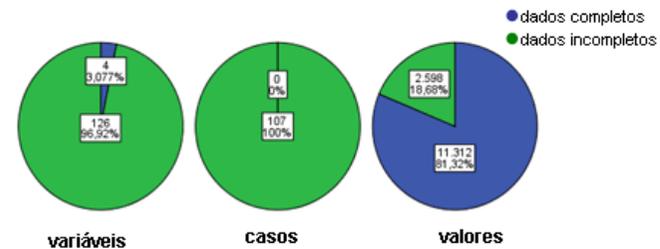
	N faltantes	%	N válido	Média	DP
Densidade_Nodal_Categ_0.72	69	65	37		
densidade nodal	69	65	37	0,30	0,42
sobrevida livre de progressão	67	64	39	419,1	468,7
S6_IHC categ Cluster Pos	57	54	49		
S6_IHC_tumor	57	54	49	13,88	10,67
AKT_IHC_sub	51	49	55	-43,27	30,48
HIF_IHC_subtração	43	41	63	-2,30	17,83
HIF_IHC_periferico	43	41	63	16,67	20,60
pten_IHC_subtração	42	40	64	-61,69	42,14
CD1_IHC_subtração	42	40	64	0,88	1,65
n_cigarros	42	40	64		
pten_IHC_periferico	41	39	65	96,23	15,46
ptenIHC categ Cluster Pos	40	38	66		
VEGF_IHC_subtração	40	38	66	-5,67	21,13
pten_IHC_tumor	40	38	66	49,45	35,62
Tempo_Tabagismo_Reduzido	40	38	66		
tempo_tabagismo	40	38	66		
S6_IHC_subtração	39	37	67	-54,70	45,40
EIF4EB1_RNA_CATEG 0.17	38	36	68		
MTOR_RNA_CATEG 0.05	38	36	68		
AKT_RNA_CATEG 0.38	38	36	68		
HIF1A_RNA	38	36	68	3,66	12,06
EIF4EBP1_RNA	38	36	68	18,63	121,1
AKT_RNA	38	36	68	1,55	3,94
VEGF_IHC_periferico	38	36	68	12,31	21,44

Em negrito as variáveis cujo "N faltantes" tem impacto analítico (as demais variáveis tiveram valores transformados em "Faltantes" por estratégia estatística. A maioria dos dados faltantes com impacto analítico correspondem à ausência de tecido urotelial periférico pareado disponível para imunistoquímica, que também interferiu nos dados de subtração de expressão proteica.

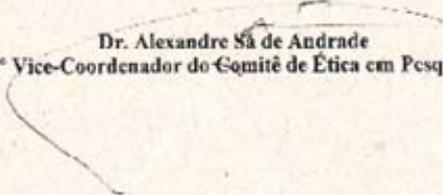
Não houve correlação importante ($> 0,7$ quando "+" ou $< -0,7$ quando "-") entre dados presentes e faltantes, entre as diferentes variáveis estudadas (vide tabela na página seguinte) demonstrando que a ocorrência de dados faltantes se deu de forma aleatória, sem gerar causalidade associada (vies ou bias).



Resumo dos dados faltantes



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

 Hospital A.C. Camargo <small>Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer</small>	Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
São Paulo, 15 de Julho de 2011.	
Ao Dr. Fernando Augusto Soares	
Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1558/11 "Expressão proteica isolada e integrada das vias mTOR e hipóxia-induzida no carcinoma urotelial invasivo de bexiga".	
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP. em sua última reunião de 28/06/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 10/05/2011, aprovaram a realização do estudo em referência, datado de 25 de maio de 2011 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:	
<ul style="list-style-type: none">> Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;> Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;> Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;> Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;> Declaração sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;> Orçamento Financeiro detalhado;> Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;> Declaração de Ciência do Departamento de Anatomia Patológica;> Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica.	
Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.	
Atenciosamente,	
 Dr. Alexandre Sá de Andrade 2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa	
1/1	
<hr/> <p>Fundação Antonio Prudente - CNPJ/MF N. 60.961.966/0001-06 Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - Uberlândia - São Paulo, SP - 01509-900 Telefons (11) 2189-5000 www.accamargo.org.br</p>	

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1558/11

Título: "Expressão protéica isolada e integrada das vias mTOR e hipóxia-induzida no carcinoma urotelial invasivo de bexiga".

Pesquisador Responsável: Dr. Fernando Augusto Soares

Aluna: Luciana Schultz (Doutorado)

Patrocinador: Será submetido à FAPESP.

Comentários gerais:

Este estudo pretende analisar as vias mTOR e hipóxia-indutível em carcinomas uroteliais invasivos, determinando o nível de expressão protéica de seus componentes, através das técnicas de imuno-histoquímica, Western blot e gene expression array. Será relacionado o status de ativação das vias com eventos de progressão e recorrência em carcinomas superficialmente invasivos (pT1) e de quimiorresistência e sobrevida em carcinomas músculo-invasivos, tratados cirurgicamente, compondo uma coorte bem definida, caracterizada retrospectivamente.

Pendências apontadas em parecer anterior da Comissão de Pesquisa – COPE:

Introdução: Existem citações que estão sem referências, inclusive na justificativa.

Prazo previsto para realização do estudo (cronograma): A técnica de western blot deve levar mais tempo para ser concluída, tem que levar em conta o tempo de padronizar a reação para cada anticorpo.

Comentários Finais:

Redefinir metodologia quanto ao número de casos;

Definir número de casos congelados para realização da técnica de Western blotting e se serão ou não os mesmos casos parafinados;

Aumentar o tempo para a realização dessa mesma técnica para 5 ou 6 bimestres, pois há a necessidade de padronização de reação para cada anticorpo.

Comentários Finais:

Os questionamentos apontados pela Comissão de Pesquisa foram devidamente respondidos, assim, o título dos documentos e o projeto foram alterados.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice - Coordenador

São Paulo, 13 de Março de 2013.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

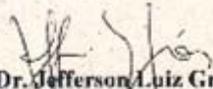
Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1558/11
"Perfil de expressão proteica, gênica e de miRNAs no carcinoma urotelial de bexiga".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 22/01/2013, tomaram conhecimento e aprovaram com sugestão a seguinte documentação:

- Emenda ao projeto versão II, datada de 2012;
- Alteração de título do projeto em referência para "Perfil de expressão proteica, gênica e de miRNAs no carcinoma urotelial de bexiga;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Relatório de Acompanhamento do estudo, datado de 27 de novembro de 2012.

Sugestão: Acrescentar ao título quais seriam as vias. Ser mais específico.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Abstracts apresentados em Congressos Internacionais (USCAP 2013 e USCAP 2015)

SCHULTZ, L., SPAGNUL, S.J.T., BEZERRA, S.M., DAMM, G.R., GIULIANGELIS, T.S., COSTA, W.H., GUIMARAES, G.C., SOARES, F.A., CUNHA, I.W. p53, pRb, Cyclin D1 and HER2 Expression in a Heterogeneous Cystectomy Cohort In: USCAP Annual Meeting 2013, Baltimore, Maryland. The 102nd Annual Meeting Abstracts 2013. V26. P.

[1033] p53, pRb, Cyclin D1 and HER2 Expression in a Heterogeneous Cystectomy Cohort

Luciana Schultz, Samuel JT Spagnul, Stephania M Bezerra, Gilcy R Damm, Thais S Giuliangelis, Walter H da Costa, Gustavo C Guimaraes, Fernando A Soares, Isabela W da Cunha. Antonio Prudente Foundation, São Paulo, Brazil; AC Camargo Hospital, São Paulo, Brazil

Background: Invasive urothelial carcinoma still carries a high mortality rate. Hence, reproducible and clinically useful prognostic markers are needed for better patient stratification. p53, pRb, cyclin D1 and HER2 are implicated in progression and invasive behavior in urothelial carcinoma. We investigated immunohistochemical expression of these markers and correlated with pathological stage and outcome. **Design:** Slides and paraffin blocks were retrieved from 98 patients with urothelial carcinoma treated by cystectomy at our institution (2000-2010). Immunohistochemistry was performed for each marker on TMA and whole slides. Pathological stage (pT) was categorized as Superficial (pTis/pTa/pT1; n=18), Muscle-invasive (pT2; n=22) and non-Organ Confined (non-OC) (pT3/pT4; n=58). For each marker cut-offs for altered expression were defined based on comparison to corresponding benign urothelial controls. Outcome data was available in 88 patients as disease specific survival (DSS), overall survival (OS) and progression. **Results:** Mean patient age was 66y (34-90) and M:F ratio was 1.85. Pre-operative BCG treatment was rendered in 16/78 (20%) patients. Altered expression of p53, pRb, cyclin D1 and HER2 was seen in 39 (39%) 21 (21%), 39 (39%) and 18 (18%) tumor samples, respectively. Markers within the same pathway significantly correlated: pRb with cyclin D1 and p53 which in turn correlated with HER2 (rr 0.2-0.3; p<0.03). Pathological stage was predictive of all outcome parameters. Abnormal expression of pRb and cyclin D1 associated with non-OC disease (p=0.05 and p=0.0001, respectively). Co-alteration of p53 and pRb was present in 14 tumors 12 of which were non-OC (p=0.02). OS, DSS and progression rate were 46%, 67% and 37%, respectively (mean FU of 52,2mo). pRb loss was a predictor of OS in superficial tumors (p=0.02) while p53 showed a trend towards progression (p=0.08) but no marker was predictive of DSS. **Conclusions:** All markers were altered in urothelial carcinoma compared to benign controls. Proteins within the same pathway were well correlated. Although high cyclin D1 expression and pRb loss were significantly more frequent in non-OC disease, prognostic value was limited in our cohort. Category: Genitourinary (including renal tumors)

Tuesday, March 5 2013 9:30 AMPoster Session III # 100, Tuesday Morning

SCHULTZ, L., DAMM, G.R., COSTA, W.H., GUIMARAES, G.C., CUNHA, I.W., SOARES, F.A. Gross Morphology Correlates with Non-Organ Confined Disease (Non-OC) in Cystectomy Specimens In: USCAP Annual Meeting 2013, Baltimore, Maryland. The 102nd Annual Meeting Abstracts 2013. V26. P.

[1034] Gross Morphology Correlates with Non-Organ Confined Disease (Non-OC) in Cystectomy Specimens

Luciana Schultz, Gilcy R Damm, Walter H da Costa, Gustavo C Guimaraes, Isabela W da Cunha, Fernando A Soares. Fundação Antonio Prudente, Sao Paulo, Brazil; AC Camargo Hospital, São Paulo, Brazil

Background: Gross and microscopic features correlate with pathological staging in cystectomy specimens. Current recommendations suggest that size and location are relevant but do not contemplate presence of ulceration or gross morphology of the lesion. **Design:** We reviewed slides from 100 patients with urothelial carcinoma treated by cystectomy at our institution (2000-2010). Adequate gross info was available on 98 reports. Gross morphology description was categorized in 4 groups: I. Papillary (n=2); II. Exophytic (n=18); III. Vegetant, Sessile or Nodular (n=32); IV: Infiltrative, Ulcerative or Flat ulcerated (n=46). Presence of ulceration was assessed independent of Gross category. Pathological stage (pT) was grouped in Superficial (pTis/pTa/pT1; n=20), Muscle-invasive (pT2; n=24) and non-OC (pT3/pT4; n=56). Dome, anterior wall and bladder neck were considered adverse locations. Tumor volume was obtained in 80 reports multiplying the 3 largest dimensions. Microscopic features such as arterial and perineural invasion, node density and positive margins were also accessed. **Results:** Mean patient age, tumor size and volume was 66 (34-90), 3.8 cm (0.8-8.5) and 35 cm³ (0.4 – 194), respectively and M:F ratio was 1.85. Gross morphology and presence of ulceration significantly correlated with pT (p=0.003 and p=0.001, respectively). All tumors from adverse locations were at least muscle invasive (p=0.09). Tumors from Gross category IV were smaller (p=0.003 for cm and 0.007 for cm³), despite association with non-OC disease. Gross category IV and presence of ulceration did not correlate with microscopic parameters but all microscopic parameters correlated with non-OC disease and among each other (p<0.03). On a multivariate analysis for non-OC disease, Gross category IV was an independent predictor of non-OC disease (p=0.009), along with arterial and perineural invasion. Node density and positive margins did not keep the significance. **Conclusions:** Ulceration and tumor gross morphology are strongly associated with non-OC bladder cancer. Therefore including this data in the cystectomy report may optimize prognostic information, along with other classic gross and microscopic parameters. Category: Genitourinary (including renal tumors)

**Monday, March 4 2013 9:30 AM Poster Session I Stowell-Orbison/Surgical Pathology/Autopsy Awards
Poster Session # 156, Monday Morning**

SCHULTZ, L., COUTINHO-CAMILLO, C.M., CASTRO, I., DAMM, SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., ONUCHIC, L.F., SOARES, F.A. **Dendrogram Analyses of Relative Expression Between Bladder Cancers and Controls Identify PTEN-HIF Association as an Alteration Characteristic of Malignancy In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.**

[1028] **Dendrogram Analyses of Relative Expression Between Bladder Cancers and Controls Identify PTEN-HIF1 α Association as an Alteration Characteristic of Malignancy.**

Luciana Schultz, Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Samuel JT Spagnul, MD, Isabela W Cunha M.D. Ph.D, Luiz F Onuchic, MD, PhD, Fernando Soares MD, PhD. AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil and Universidade de São Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil.

Background: Drugs that target the PIK3/AKT/mTOR pathway are been considered for advanced or post-cisplatin bladder cancer. Clinical trials have shown long term response in some patients but resistance is not infrequent and relates to PTEN loss. Here we compare and measure intrinsic associations between mTOR pathway members and their main known interactions, in malignant and nonmalignant urothelial tissue. **Design:** Samples from 101 bladder tumors resected by cystectomy and adjacent histologically benign urothelium (paired control) were collected. Markers (proteins/genes) of cell cycle, mTOR and hypoxia-inducible pathway were analyzed by immunohistochemistry (IHC) and RTPCR. Relative expression of tumors and controls was obtained by subtraction (IHC) or division (RTPCR). Dendrograms were constructed to compare and measure intrinsic associations. A discriminatory multivariate analysis was used to separate variables (Wilks Lambda test) and measure centroid distances (Mahalanobis test). Cluster analysis was then used to determine the associations and categorize groups. The markers were organized by median connection within groups as elements of a tree, where the leaves represent patients and the length between knots represent distance by Pearson correlation. An $\alpha \leq 5\%$ was adopted for type I error and $\beta \leq 20\%$ for type II. **Results:** The dendrogram of immunoexpression in controls followed a physiological array, discriminating the different pathways and linking hypoxia with cell cycle proteins before connection with the mTOR branch. In tumors, dendrograms of relative expression showed significant association between PTEN and HIF1 α , both at the protein and gene expression levels. The imbalance included association between pRB and the pS6/pAKT duet displayed by IHC. The finding of association between caspase3 and AKT3 mRNA expression was also suggestive of pathway deregulation. Analysis of absolute expression in tumor samples did not reveal association between PTEN and HIF1 α . **Conclusion:** mTOR and hypoxia pathways are deregulated in bladder tumors and a PTEN-HIF1 α association may play a pivotal role. Analyzing the relative expression between tumors samples and adjacent histologically benign urothelium seems more robust than tumor expression alone. Our results are in line with targeted therapy for mTOR and hypoxia pathways in bladder cancer and further suggest that combined inhibition might be beneficial.

Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 119, Tuesday Morning

COUTINHO-CAMILLO, C.M., SCHULTZ, L., CASTRO, I., DAMM, SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., ONUCHIC, L.F., SOARES, F.A. **Dendrogram Analyses of Relative Expression Between Bladder Cancers and Controls Identify PTEN-HIF Association as an Alteration Characteristic of Malignancy In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.**

[849] Low Immunoexpression of phosAKT Correlates with Upregulation of mTOR Pathway and HIF1 α Gene Expression

Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Luciana Schultz, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Isabela W Cunha M.D. Ph.D, Luiz F Onuchic, MD, PhD, Fernando Soares MD, PhD. AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil and Universidade de São Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil.

Background: Drugs that target the PIK3/AKT/mTOR pathway are been considered for advanced or post-cisplatin bladder cancer. Clinical trials have shown long term response in some patients but resistance is not infrequent and is may relate to pathway interactions or deregulation. Accessible biomarkers of tumor response are needed for better patient selection. **Design:** Samples from 72 bladder tumors resected by cystectomy and adjacent histologically-benign urothelium (paired control) were collected. Immunohistochemistry (IHC) for phosAKT (Ser473) was performed and scored as percent of positive cells. Cluster analysis identified 2 groups and a cut-off of 3.3 was reached by ROC curve. Gene expression of mTOR pathway members (PTEN, AKT3, MTOR, EIF4EBP1 and RPS6), HIF1 α and cell cycle (TP53, RB1 and MIK67) were analyzed by RT-PCR. Categorized phosAKT expression was then compared to mRNA levels by Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test. **Results:** Mean (median) phosAKT expression was 18.8 (10.0) in malignant samples and 61.8 (70.0) in controls. Tumors in the cluster with lower levels of phosAKT (n=7) significantly associated with higher mRNA expression of all genes related with mTOR pathway and HIF1 α (p<0.001), but not with those related to cell cycle (p=NS). Mean mRNA expression in this subset compared to the remaining samples were 3.45 vs. 0.44 for PTEN 2.87 vs. 0.08 for AKT3 19.53 vs. 0.09 for MTOR 15.70 vs. 0.18 for EIF4EBP1, 6.12 vs. 0.24 for RPS6 and 14.17 vs. 0.12 for HIF1 α . **Conclusion:** Bladder tumors showed lower levels of phosAKT compared to adjacent histologically-benign urothelium, suggesting that phosAKT loss is implicated in bladder oncogenesis. Furthermore, the subset with more intense loss showed significant upregulation of mTOR pathway and HIF1 α gene expression.

Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 126, Tuesday Morning

SCHULTZ, L., COUTINHO-CAMILLO, PUGA, R.D., C.M., CASTRO, I., DAMM, G.R., SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., SOARES, F.A.; A miRNA Profile Identifies a Subset of Bladder Cancers with Favorable Prognosis that Are Enriched for phosS6 Overexpression In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.

[1027] A microRNA Profile Identifies a Subset of Bladder Cancers with Favorable Prognosis that Are Enriched for phosS6 Overexpression.

Luciana Schultz, Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Renato D Puga MSc, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Samuel JT Spagnul, MD, Isabela W Cunha, Dr, MD, PhD and Fernando A Soares Md, PHD.

AC Camargo Cancer Center, Pathology, Sao Paulo, Brazil; Hospital Israelita Albert Einstein, Center for Clinical Research, Sao Paulo, Brazil; Universidade de Sao Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil and Instituto de Anatomia Patologica, Santa Barbara d'Oeste, Brazil.

Background: mTOR inhibition is being considered for advanced and cisplatin-resistant bladder cancer. miRNAs have been implicated in mTOR pathway downregulation in a subset of bladder cancers. **Design:** The cohort consisted of 74 patients treated by cystectomy for urothelial carcinoma: 10/74 (14%) pTa/pTis/pT1 21/74 (28%) pT2, and 43/74 (58%) pT3/pT4. Immunohistochemistry was performed for phosS6 (Ser 235/236): 35/74 tumors were negative, 31/74 showed low levels and 8/74 showed high levels (cut-off of 22.5% of positive cells). We applied parametric statistical method t-test with 1000 permutations and p-value <0.05, to identify differentially expressed miRNAs. With these data, we did a hierarchical cluster supported with Pearson correlation that identified two main groups. A miRNA microarray was performed for all tumors. **Results:** Cluster analysis revealed 17 differentially expressed miRNAs, broadly dividing the samples into two groups: one with a miRNA over-expression profile and other with an under-expression signature. Cluster I showed up-regulation of mir-29, mir-130, and mir-518, and Cluster II showed down-regulation of mir-493, mir-125a, mir-320, mir-204 and mir-145. Opposite profiles were observed for mir-382, mir-324, mir-492 and mir-138, which were up-regulated in Cluster I while down-regulated in Cluster II. Seven/8 phosS6 overexpressers belonged to Cluster II. Furthermore, clinic-pathological and outcome differences were significant (p<0.033). Cluster I was composed predominantly of males (75%) 12/42 (29%) patients were younger than 60y, with non-papillary tumors enriched for squamous differentiation. Half (51%) of patients in Cluster II were females 26/31 (84%) patients were older than 60y, often with multifocal tumors (11/31; 35%) enriched with papillary histology. Pathological stage, perineural or vascular invasion, and node or margin status were not significantly different between the two groups. Mean follow-up time (75 percentile) was 8.15 years. Disease-specific survival in Cluster I was 49% while 74% in Cluster II (p=0.028). **Conclusion:** We reveal several miRNAs possibly implicated in mTOR regulation in bladder cancers. Their profile may be able to distinguish a favorable prognostic group, with similar sex distribution and older age group, whose tumors are enriched for phosS6 overexpression, papillary histology and multifocal disease.

Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 128, Tuesday Morning

SCHULTZ, L., COUTINHO-CAMILLO, PUGA, R.D., C.M., CASTRO, I., DAMM, G.R., SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., SOARES, F.A.; Overexpression of mTOR Pathway Members Reveals Different microRNA Backgrounds that Can Be Linked by phosS6 In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.

[1029] Overexpression of mTOR Pathway Members Reveals Different microRNA Backgrounds that Can Be Linked by phosS6.

Luciana Schultz, Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Renato D Puga MSc, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Samuel JT Spagnul, MD, Isabela W Cunha, Dr, MD, PhD and Fernando A Soares Md, PHD.

AC Camargo Cancer Center, Pathology, Sao Paulo, Brazil; Hospital Israelita Albert Einstein, Center for Clinical Research, Sao Paulo, Brazil; Universidade de Sao Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil and Instituto de Anatomia Patologica, Santa Barbara d'Oeste, Brazil.

Background: PI(3)K/AKT/mTOR/CCND1 pathway alterations have been reported to be frequent and mutually exclusive in urothelial cancer. microRNAs (miRNA) are implicated in mTOR pathway down-regulation in a subset of bladder tumors. **Design:** Immunohistochemistry for pAKT(Ser473), cyclin D1 and pS6 (Ser235/236) was conducted on a well-characterized cohort of 74 urothelial tumors of patients treated by cystectomy and paired peripheral histologically-benign urothelium. Each maker was scored as percent of positive cells and relative expression between malignant and benign samples was calculated by subtraction. A cut-off was reached by ROC curve for the positive tumor samples and higher levels were considered overexpression (high) for pAKT (n=6), cyclin D1 (n=14) and pS6 (n=8). Within this subset, we applied the parametric statistical method t-test with 1000 permutations and p-value <0:05, to identify differentially expressed miRNAs. With these data, we did a hierarchical cluster supported with Pearson correlation. This cluster showed three distinct groups, one been negative expression. A miRNA microarray was then performed. **Results:** Overexpression of pAKT and cyclin D1 were mutually exclusive events, accurately classified by unsupervised cluster analysis (n=20) of the miRNA matrix. Five/8 pS6-high belonged to this group and most of them (4/5) coincided with cyclin D1-high. There were 21 differentially expressed miRNAs, mainly related to tissue differentiation, and also to epithelial-mesenchymal transition, apoptosis and immune response. Up-regulated miRNAs included mir-200 family, mir-20, mir-10 and mir-90 and down-regulated miRNAs included mir-199 family, mir-146 family and mir-150. Cyclin D-high samples were broadly divided into two halves, one of them having a profile that was more similar to that of pAKT-high than the remaining samples, and this subset included all 5 pS6-high tumors. **Conclusion:** Our findings suggest that overexpression of cyclin D1 and pAKT are mutually exclusive in bladder cancer and bare different miRNA epigenetic background. Overexpression of pS6 is frequent in this scenario and more often coincide with overexpression of cyclin D1. This event seems to approach the miRNA profiles of cyclin D1 and pAKT in up-regulated tumors.

Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 120, Tuesday Morning