

Ana Filipa da Silva Cerqueira

*"A expressão dos antígenos STn, S6T e do índice de proliferação Ki67
no carcinoma da bexiga"*

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Ana Filipa da Silva Cerqueira

*"A expressão dos antígenos STn, S6T e do índice de proliferação Ki67
no carcinoma da bexiga"*

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2014

Ana Filipa da Silva Cerqueira

*"A expressão dos antígenos STn, S6T e do índice de proliferação Ki67
no carcinoma da bexiga"*

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de mestre em Técnicas Laboratoriais Especializadas -
Análise Biomédica

SUMÁRIO

Introdução - O carcinoma da bexiga é considerado o quarto tumor maligno mais comum e a oitava causa de morte por cancro. O tipo mais comum é o carcinoma urotelial da bexiga (CUB) correspondendo, aproximadamente, a 90% dos casos. O sistema de estadiamento TNM fornece estimativas úteis sobre o risco de progressão/recorrência da doença e sobrevida dos pacientes, mas a heterogeneidade da biologia tumoral conduz a variações significativas. A *O*-glicosilação aberrante é uma das mais comuns modificações pós-tradução associadas ao cancro. A utilização de biomarcadores (como antígenos carboidratados associados a tumor - TACAs) poderá contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos biológicos subjacentes à progressão tumoral, especialmente no que se refere ao papel da glicosilação na evolução do carcinoma da bexiga.

Materiais e Métodos - Neste trabalho, composto por amostras de 96 doentes com CUB de vários graus e estádios, foi avaliada a imunexpressão dos antígenos glicosídicos sialil Tn (STn) e sialil T (S6T) e também do índice de proliferação Ki67, tendo sido correlacionada com os parâmetros clínico-patológicos em estudo, e com a sobrevida global.

Resultados - Verificou-se que 39 casos tinham expressão negativa para o STn e 57 tinham expressão positiva. A expressão do antígeno glicosídico STn associou-se ao alto grau de diferenciação celular ($p=0,012$), estágio tumoral avançado ($p=0,001$), morte por cancro ($p=0,030$), metastização ganglionar ($p=0,043$) e a tumores com proliferação celular descontrolada ($p=0,022$). Foi, também, verificado que a sobrevida global nos doentes com tumores que expressavam o STn era significativamente menor ($p=0,034$). Neste trabalho, o antígeno S6T não se mostrou informativo. Relativamente ao Ki67, os resultados mostraram que este marcador se correlaciona com o estágio de invasão e com grau de diferenciação.

Conclusões - Neste estudo, o antígeno STn revelou-se um bom marcador de diagnóstico e subsequentemente de prognóstico do cancro, podendo representar um alvo terapêutico útil na imunização de doentes com CUB.

Palavras-chave: carcinoma da bexiga, STn, Ki67, prognóstico

ABSTRACT

Introduction - Bladder cancer is considered the fourth most common cancer and the eighth cause of death from this pathology. Urothelial bladder cancer (UBC) corresponds to 90% of all bladder cancers. TNM staging system gives useful estimate about disease progression/recurrence and patients overall survival. However tumoral biology heterogeneity leads to significant variations. Aberrant *O*-glycosilation is one of the most common post translation modification associated with cancer. The use of biomarkers (like tumor antigens cancer associated - TACAs) may contribute to a better understanding of the tumoral progression underlying biological mechanisms, specially the role of glycosilation in bladder cancer evolution.

Material and Methods - This work comprises samples from 96 patients with bladder cancer of all stages and grades. It was evaluated the STn, S6T and Ki67 immunoexpression, being correlated with clinical pathological parameters and overall survival.

Results - Thirty-nine cases had negative STn expression, while 57 had positive expression. Positive STn antigen expression was associated with high grade ($p=0,012$), high stage ($p=0,001$), death from cancer ($p=0,030$), node metastization ($p=0,043$) and tumors with uncontrolled cell proliferation ($p=0,022$). Overall survival in those patients who expressed STn was significantly lower ($p=0,034$). In the present work the S6T expression was not informative. The results also showed that Ki67 correlates with histological grade and stage.

Conclusions - In this study STn antigen revealed as a good diagnostic and prognostic cancer marker, which means that it could represent a useful therapeutic target in the bladder cancer patient's immunization.

Key-words: bladder cancer, STn, Ki67, prognostic

ÍNDICE

I - Introdução	12
1.1 - Aspetos epidemiológicos	12
1.1.1 - Fatores de risco	12
1.2 - Carcinoma urotelial e sua evolução clínica	14
1.2.1 - Sintomas	19
1.2.2 - Diagnóstico	19
1.2.3 - Tratamento	21
1.3 - Objetivos	26
II - Desenvolvimento	27
2.1 - Glicosilação aberrante e cancro	27
2.2 - Índice de proliferação Ki67 e cancro	36
2.3 - Material e Métodos	37
2.3.1 - População e variáveis em estudo	37
2.3.2 - Estudo imunohistoquímico	39
2.3.3 - Avaliação e quantificação da imunorreatividade	39
2.3.4 - Análise estatística	40
2.4 - Resultados	40
2.4.1 - Grau de diferenciação e estágio tumoral	40
2.4.2 - STn e parâmetros clínico-patológicos estudados	41
2.4.3 - STn e índice de proliferação Ki67	44
2.4.4 - Índice de proliferação Ki67 e parâmetros clínico-patológicos estudados	46
2.4.5 - Sobrevida global	48
2.5 - Discussão	51

2.6 - Conclusões	55
III - Conclusão geral	56
IV - Referências Bibliográficas	57
V - Anexos	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Principais variantes fenotípicas do CUB (variante papilar e variante invasiva do tumor).	15
Figura 2 - Vias divergentes da tumorigénese urotelial e sua progressão.	15
Figura 3 - Extensão da invasão do tumor primário (T) da bexiga.	16
Figura 4 - Principais classes de hidratos de carbono animais.	28
Figura 5 - Diferenças entre glicoproteínas normal (com oligossacáridos normais) e associada a tumor (com oligossacáridos encurtados).	29
Figura 6 - Vias biossintéticas dos <i>O</i> -glicanos do tipo mucinas mais comuns.	30
Figura 7 - Antígenos Tn e T.	31
Figura 8 - Antígeno STn.	33
Figura 9 - Imunoexpressão STn positiva, 10x.	42
Figura 10 - Imunoexpressão STn positiva, 40x.	42
Figura 11 - Imunoexpressão Ki67 positiva, 10x.	46
Figura 12 - Imunoexpressão Ki67 positiva, 10x.	47
Figura 13 - Sobrevida global em função do antígeno STn.	49
Figura 14 - Sobrevida global em função do estágio tumoral.	50
Figura 15 - Sobrevida global em função do grau de diferenciação.	50
Figura 16 - Sobrevida global em função do índice de proliferação Ki67.	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação TNM de carcinomas da bexiga urinária conforme a OMS de 2004.	17
Tabela 2 - Classificação da OMS de 1973 para neoplasias uroteliais.	19
Tabela 3 - Classificação da OMS de 2004 para neoplasias uroteliais.	19
Tabela 4 - Parâmetros clínico-patológicos da amostra estudada ($n=96$ casos).	38
Tabela 5 - Grau de diferenciação e estágio dos carcinomas uroteliais da bexiga estudados.	41
Tabela 6 - Expressão do antigénio carbohidratado STn segundo o grau de diferenciação tumoral.	41
Tabela 7 - Expressão do antigénio carbohidratado STn segundo o estágio tumoral.	43
Tabela 8 - STn e morte por cancro.	43
Tabela 9 - STn e gânglios metastizados.	44
Tabela 10 - STn e índice de proliferação Ki67.	44
Tabela 11 - Ki67 e S6T	45
Tabela 12 - Ki67 e STnS6T	45
Tabela 13 - Expressão do índice de proliferação Ki67 segundo o grau de diferenciação tumoral.	46
Tabela 14 - Expressão do índice de proliferação Ki67 segundo o agrupamento de estádios.	47
Tabela 15 - Expressão do índice de proliferação Ki67 segundo o tipo de tumor.	48

ABREVIATURAS

BCG – Bacilo *Calmette-Guérin*

CUB – Carcinoma urotelial da bexiga

DST – Antígeno T di-sialilado

Gal – Galactose

GalNAc – N-acetilgalactosamina

GC – Gemcitabina/cisplatina

ISUP – *International Society of Urologic Pathologists*

KLH – *Keyhole Limpet Hemocyanin*

MMC – Mitomicina C

MVAC – Metotrexato, vinblastina, adriamicina, e cisplatina

NeuAc – Ácido acetilneuramínico ou ácido siálico

OMS – Organização Mundial da Saúde

ppGalNAcT – Polipéptidos *N*-acetilgalactosamina transferases

PUNLMP – Neoplasias uroteliais papilares de baixo potencial maligno

RTU – Ressecção transuretral

SEER – *Surveillance, Epidemiology and End Results*

STn – Antígeno sialil Tn (NeuAc-GalNAc-*O*-Ser/Thr)

S3T – Antígeno sialil T (NeuAc-Gal-GalNAc-*O*-Ser/Thr)

S6T – Antígeno sialil T (Gal-NeuAc-GalNAc-*O*-Ser/Thr)

TACAs – Antígenos carboidratados associados a tumor

T, TF – Antígeno *Thomsen-Friedenreich* (Gal-GalNAc-*O*-Ser/Thr)

Tn – Antígeno T *nouvelle* (GalNAc-*O*-Ser/Thr)

TNM – Tumor primário, Nódulos linfáticos regionais, Metástases distantes

I - Introdução

1.1 - Aspetos epidemiológicos

O carcinoma da bexiga é considerado o quarto tumor maligno mais comum e a oitava causa de morte por cancro, na população masculina Americana. De acordo com a *American Cancer Society*, as estimativas nos Estados Unidos para o ano de 2013 são 72 570 novos casos e 15 210 mortes por esta patologia. O *ratio* homem/mulher é aproximadamente 3:1 (*American Cancer Society*, 2013).

O carcinoma da bexiga é uma doença associada a idades mais avançadas, em que 50% dos casos ocorre em pessoas a partir dos 65 anos. As idades medianas dos homens e mulheres no momento do diagnóstico são 72 e 74 anos, respetivamente (*National Cancer Institute*, 2006-2010).

Existem evidências de que os tumores da bexiga apresentam taxas de incidência e mortalidade variáveis entre indivíduos de diferentes raças. Nos Estados Unidos, há uma maior ocorrência na população caucasiana, contudo, devido ao diagnóstico tardio, as taxas de mortalidade são maiores em afro-americanos (*Sharma et alii*, 2009). As maiores taxas de incidência, igualmente, verificam-se em comunidades urbanas, mas estão a aumentar em sociedades rurais devido ao crescimento e envelhecimento da população mundial, e à exposição a determinados fatores de risco (*Metts et alii*, 2000).

Em Portugal, segundo os dados do Registo Oncológico Regional Norte, Centro, Sul, da Madeira e dos Açores, em 2006 ocorreram 1711 novos casos de carcinoma da bexiga, dos quais 1336 no sexo masculino e 375 no sexo feminino. Comparativamente, surgiram 700 óbitos, destes 514 eram homens e 186 mulheres. O carcinoma da bexiga, nesse ano, ocupou o sétimo lugar no ranking dos tumores malignos mais comuns e o oitavo lugar nas principais causas de morte por cancro (*Registo Oncológico Nacional*, 2006).

1.1.1 - Fatores de risco

A idade é um fator de risco para o desenvolvimento de cancro da bexiga, uma vez que, ocorre mais comumente em idosos (*Jacobs et alii*, 2010).

Para além da idade, numerosos fatores de risco têm sido fortemente associados ao desenvolvimento desta patologia. Todavia, o tabagismo é a sua principal causa, estando associado a 50% dos casos nos homens e 35% nas mulheres. Nos fumadores o risco para carcinoma da bexiga é acrescido em 2 a 4 vezes comparativamente aos não fumadores, e este risco aumenta com a intensidade e duração do hábito de fumar. Caso o hábito cesse, o risco para cancro da bexiga decresce cerca de 30% após 1 a 4 anos e 60% após 25 anos, mas nunca retorna para o nível de risco dos não fumadores (Colombel *et alii*, 2008). O tabaco contém ~4000 químicos, muitos deles genotóxicos, como os componentes *N*-nitroso e aminas aromáticas, por exemplo 4-aminobifenil (4-ABP) e *O*-toluidina. Um mecanismo pelo qual as aminas induzem a carcinogénese consiste na formação de aductos de DNA, que resultam em mutações (Yoon *et alii*, 2012). O espectro de ligação de DNA-4-ABP evidencia o envolvimento deste carcinogénico químico na carcinogénese urotelial, que se correlaciona com mutações no gene *TP53*. Aductos de DNA-4-ABP são, por isso, detetados em níveis significativamente mais elevados, em células exfoliativas na urina e biópsias de carcinoma da bexiga de fumadores, em comparação com não fumadores (Crallan *et alii*, 2006).

A exposição ocupacional a carcinogénicos uroteliais é considerada a segunda causa mais importante de cancro da bexiga, com 5-20% de todos os casos. Este tipo de tumor tem uma associação bem documentada com carcinogénicos químicos (aminas aromáticas entre outros) utilizados nas indústrias química, têxtil, de metal, tecidos, corantes e transformação de borracha (Colombel *et alii*, 2008). Sabe-se que, muitas vezes, a doença só ocorre 30 a 50 anos após a exposição (Jacobs *et alii*, 2010).

Outras situações de risco potencial são as infeções do trato urinário e irritações crónicas resultantes de cateteres ou cálculos na bexiga. Da mesma forma, o tratamento com drogas (ciclofosfamida) em pessoas com cancro pode aumentar o risco desta doença na bexiga, pois é um reservatório dos produtos de eliminação (Metts *et alii*, 2000). O tratamento da região pélvica ou abdominal por radioterapia, também gera um aumento do risco de tumores malignos da bexiga (Sharma *et alii*, 2009).

O risco de se desenvolver carcinomas da bexiga pode variar em diferentes países. Em algumas áreas do mundo, como em Taiwan, os altos níveis de arsénio na água potável originam elevados números desta doença. Também a infeção da bexiga pelo parasita

Schistosoma haematobium, endêmica no Egito, está relacionada com o desencadeamento do cancro (Jacobs *et alii*, 2010).

Está também comprovado que pessoas com história familiar de cancro da bexiga têm um aumento do risco da doença, particularmente aqueles com parentes em primeiro grau que desenvolveram o tumor em idades inferiores ou igual a 60 anos. Os casos de tumores da bexiga em indivíduos da mesma família são raros e por este motivo se realça a possível predisposição genética (Colombel *et alii*, 2008).

De acordo com o National Cancer Institute, uma história pessoal de cancro da bexiga, também aumenta o risco das pessoas desencadearem novamente a doença (National Cancer Institute).

Apesar de se tratar de uma doença de origem multifatorial com diversos fatores de risco conhecidos, em muitos pacientes com cancro da bexiga estes não são identificáveis, e noutros indivíduos, a doença não se desenvolve mesmo estando expostos a esses fatores (Jacobs *et alii*, 2010).

1.2 - Carcinoma urotelial e sua evolução clínica

O tipo mais comum é o carcinoma urotelial da bexiga (CUB) correspondendo, aproximadamente, a 90% dos casos, sendo os restantes 10% não-uroteliais (carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma) ou de origem mesenquimatosa (Sharma *et alii*, 2009).

O CUB surge a partir do urotélio, epitélio de células de transição, que se estende desde a pelve renal através dos ureteres, bexiga e uretra (Tanaka e Sonpavde, 2011). Os CUB apresentam-se como um grupo heterogéneo de tumores com duas principais variantes fenotípicas, variante papilar de baixo grau e variante invasiva do tumor, ambas tendo comportamentos biológicos e prognósticos totalmente diferentes (Cohen *et alii*, 2000). (Figura 1)

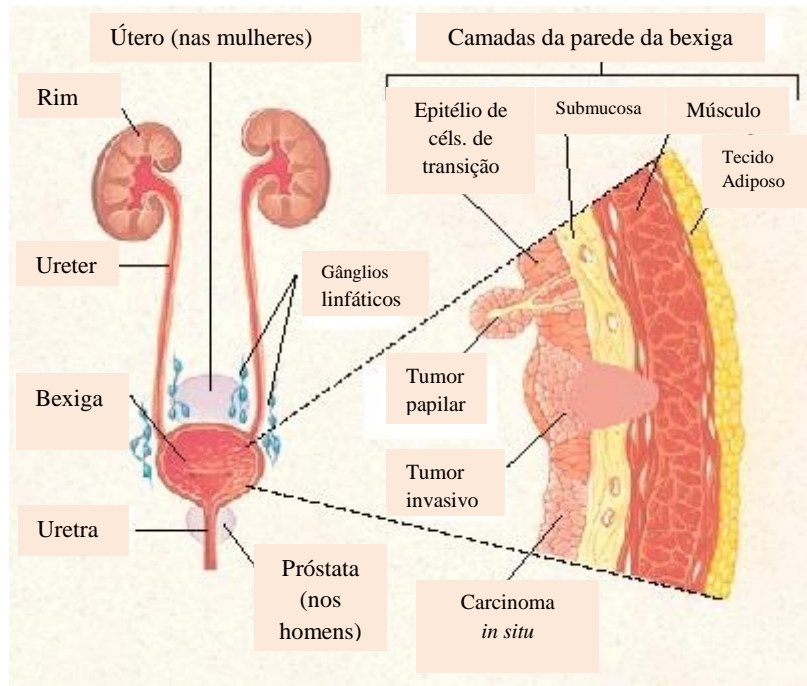


Figura 1 - Principais variantes fenotípicas do CUB (variante papilar e variante invasiva do tumor). Adaptado de Drug Information Online.

Segundo dados clínicos e experimentais, estes carcinomas surgem e progridem ao longo de duas vias distintas (Cohen *et alii*, 2000). (Figura 2)

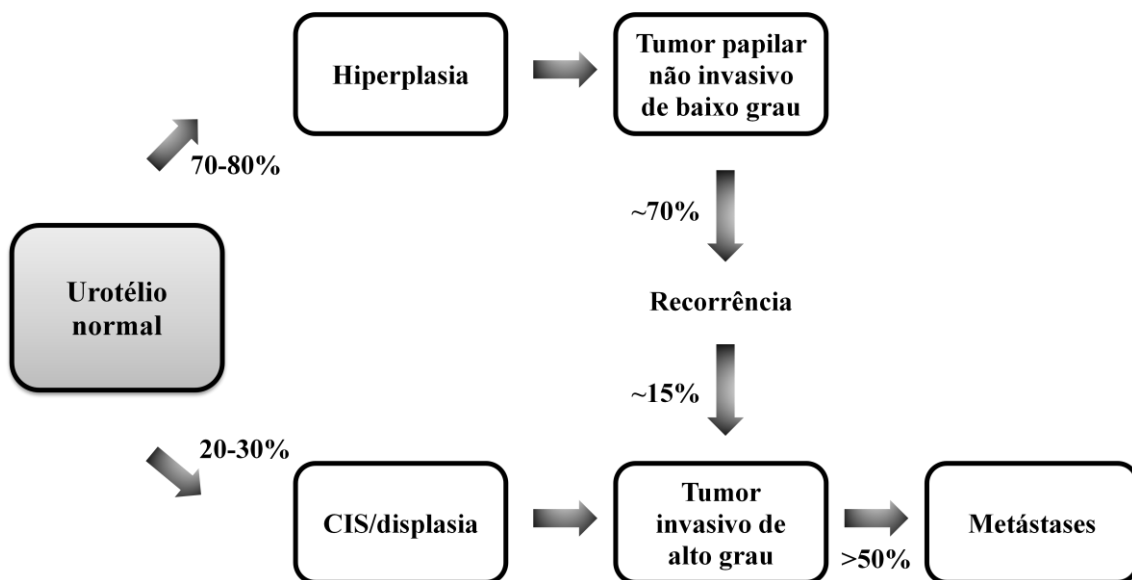


Figura 2 - Vias divergentes da tumorigênese urotelial e sua progressão. O CUB é classificado em duas vias com distintos padrões histopatológicos e comportamentos clínicos. Adaptado de Jacobs *et alii*, 2010.

Cerca de 70% a 80% dos CUB são geralmente precedidos por hiperplasia simples e papilar, e exibem uma morfologia tumoral papilar, não-invasiva e de baixo grau (primeira via tumoral). Aproximadamente 70% destes tumores recidivam, mas apenas 15% progridem e invadem a camada muscular (Jacobs *et alii*, 2010). Os CUB não-invasores de baixo grau (1ª via tumoral) têm uma baixa taxa de progressão, enquanto, os CUB invasivos de alto grau (2ª via tumoral) têm um alto potencial maligno associado com significativa progressão e mortalidade (Kirkali *et alii*, 2005). Cerca de 20 a 30% dos CUB são tumores músculo-invasivos de alto grau, com origem em carcinoma *in situ* (CIS, segunda via tumoral), sendo que mais de 50% progridem, dando origem a metástases locais e distantes (Jacobs *et alii*, 2010).

Os carcinomas da bexiga são classificados segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) de 2004 pela sua propagação e estadiamento (Eble *et alii*, 2004). Uma ilustração representativa da extensão da invasão tumoral é mostrada na Figura 3 e o estadiamento do CUB segundo a classificação TNM (Tumor Nódulos Metástases) é apresentado na Tabela 1.

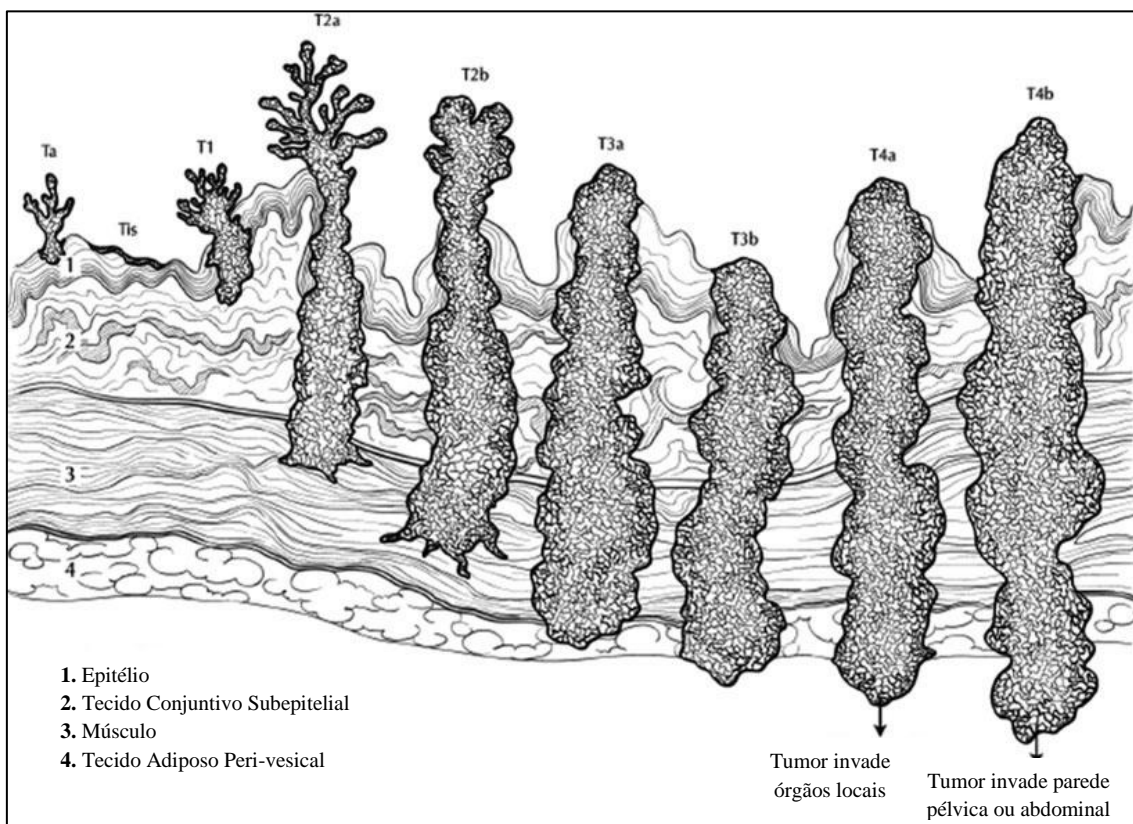


Figura 3 - Extensão da invasão do tumor primário (T) da bexiga. Adaptado de Jacobs *et alii*, 2010.

Tabela 1 - Classificação TNM de carcinomas da bexiga urinária conforme a OMS de 2004. Adaptado de Eble *et alii*, 2004.

Classificação TNM	
T - Tumor Primário	
TX	Incapacidade de avaliação do tumor primário
T0	Nenhuma evidência do tumor primário
Ta	Carcinoma papilar não-invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : "flat tumor"
T1	Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor invade o músculo
T2a	Tumor invade o músculo superficial (metade interna)
T2b	Tumor invade o músculo profundo (metade externa)
T3	Tumor invade o tecido perivesical
T3a	Microscopicamente
T3b	Macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor invade qualquer um dos seguintes: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal
T4a	Tumor invade próstata, útero ou vagina
T4b	Tumor invade parede pélvica ou parede abdominal
N - Nódulos Linfáticos Regionais	
NX	Incapacidade de avaliação de nódulos linfáticos regionais
N0	Nódulos linfáticos regionais sem metástases
N1	Metástases num único nódulo linfático, inferior ou igual a 2 cm
N2	Metástases num único nódulo linfático superior a 2 cm e inferior ou igual a 5 cm Múltiplos nódulos linfáticos inferiores ou iguais a 5 cm
N3	Metástases em, pelo menos, um nódulo linfático superior a 5 cm
M - Metástases Distantes	
MX	Impossível avaliar a presença de metástases
M0	Ausência de metástases distantes
M1	Metástases distantes
Agrupamento de Estádios	
E. 0a	(Ta;N0;M0)
E. 0is	(Tis;N0;M0)
E. I	(T1;N0;M0)
E.II	(T2a,b;N0;M0) (T3a,b;N0;M0)
E.III	(T4a,b;N0;M0)
E. IV	(Qualquer T;N1,N2,N3;M0) (Qualquer T; Qualquer N;M1)

O CUB pode apresentar-se como não-músculo-invasivo, músculo-invasivo ou metastático. Na avaliação histopatológica, os tumores não-músculo-invasivos incluem lesões confinadas ao epitélio (Ta, Tis) e tecido conjuntivo subepitelial – lâmina própria (T1), que não invadem o músculo detrusor (Kamat e Mathew, 2011). É de salientar que os tumores limitados ao urotélio, Ta e Tis, possuem diferentes configurações. As lesões

de estágio Ta possuem uma configuração papilar da sua porção exofítica e os tumores *in situ* (Tis) são carcinomas de alto grau (anaplásicos) confinados ao urotélio, mas com uma configuração plana não papilar (Babjuk *et alii*, 2013). Os tumores músculo-invasivos abrangem lesões com estadiamento igual ou superior a T2 e os tumores metastáticos são classificados segundo o sistema N (nódulos linfáticos regionais) e M (metástases distantes) (Kamat e Mathew, 2011).

O sistema de estadiamento TNM fornece estimativas úteis sobre o risco de progressão/recorrência da doença e sobrevida dos pacientes, mas a heterogeneidade da biologia tumoral e as características particulares do doente (idade, sexo, comorbilidades, tratamentos prévios) conduzem a variações significativas (Jacobs *et alii*, 2010). Dadas todas as variáveis não contabilizadas no sistema TNM, existe uma necessidade de identificar melhor os pacientes que têm um alto risco de recorrência da doença (para que sejam submetidos a politerapia adequada) e aqueles com carcinomas suscetíveis de progredir (para que sejam tratados de forma mais agressiva) (Kamat e Mathew, 2011). A utilização de biomarcadores (capítulo II) pode ajudar a alcançar esses objetivos.

Para além da arquitetura tecidual, as células individuais apresentam diferentes graus de anaplasia. O sistema mais amplamente utilizado para classificação de neoplasias uroteliais tem sido a classificação da OMS de 1973, que tem designações para papiloma e carcinomas em grau 1, 2 e 3 (Tabela 2). Um novo sistema foi proposto inicialmente pela OMS e ISUP (*International Society of Urologic Pathologists*) em 1998 e atualizado em 2004 para classificação de neoplasias papilares. Os tumores papilares são classificados tanto como neoplasias uroteliais papilares de baixo potencial maligno (PUNLMP) ou como carcinomas uroteliais papilares, sendo este último subdividido em dois tipos: de baixo grau e alto grau (Tabela 3) (Epstein *et alii*, 1998; Sauter *et alii*, 2004). A nova categoria de neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno foi criada para descrever lesões com um aumento do número de camadas uroteliais em comparação com o papiloma mas sem características citológicas de malignidade (Jacobs *et alii*, 2010). Este sistema de classificação, por sua vez, define o Tis como uma lesão não papilar, plana, em que o epitélio de superfície contém células malignas. No entanto, até que a classificação da OMS de 2004 seja validada por mais ensaios clínicos, os tumores devem ser classificados recorrendo a ambas classificações, de 1973 e de 2004 (Babjuk *et alii*, 2013; Witjes *et alii*, 2013).

Tabela 2 - Classificação da OMS de 1973 para neoplasias uroteliais. Adaptado de Epstein *et alii*, 1998 e Sauter *et alii*, 2004.

Classificação da OMS de 1973

Papiloma urotelial

Grau 1: bem diferenciado

Grau 2: moderadamente diferenciado

Grau 3: pouco diferenciado

Tabela 3 - Classificação da OMS de 2004 para neoplasias uroteliais. Adaptado de Epstein *et alii*, 1998 e Sauter *et alii*, 2004.

Classificação da OMS de 2004

Papiloma urotelial

Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno

Carcinoma urotelial papilar de baixo grau

Carcinoma urotelial papilar de alto grau

1.2.1 - Sintomas

São vários os sintomas que um doente com carcinoma da bexiga pode apresentar. A presença de sangue na urina (hematúria indolor) é o sintoma mais comum, sendo a macroscópica a mais incidente (Pashos *et alii*, 2002). Todavia, outros sintomas como a irritação da bexiga (dor/dificuldade ao urinar - disúria - e frequência urinária - polaquiúria) podem manifestar-se, sobretudo, nos doentes com Tis. Nos casos de doença avançada, poderão surgir ainda dores nos flancos causadas pela obstrução uretral e dores abdominais, pélvicas ou ósseas provenientes de metástases distantes (Sharma *et alii*, 2009).

1.2.2 - Diagnóstico

A investigação clínica de um doente com hematúria começa com a anamnese (incluindo histórias de tabagismo ou exposição ocupacional) e exames físicos pélvico e retal (Metts *et alii*, 2000). Estudos dirigidos devem incluir cistoscopia vesical e ainda uma amostra

de urina para citologia e outra para cultura de células, de modo a excluir casos de infecção (Sharma *et alii*, 2009).

As biopsias ou a ressecção transuretral (RTU) são realizadas quando o tumor é visualizado por cistoscopia vesical, ou a citologia é sugestiva de malignidade (Metts *et alii*, 2000). No caso dos doentes do sexo masculino, biopsias da uretra prostática, em particular, são recomendadas em casos de tumores do colo da bexiga, presença ou suspeita de Tis, citologia positiva sem evidências de tumor vesical, ou anomalias visíveis na uretra prostática. Biopsias do colo da bexiga e margem uretral devem, também, ser realizadas antes ou no momento da cistoscopia vesical, em mulheres posteriormente submetidas a neobexiga ortotópica (Babjuk *et alii*, 2013; Witjes *et alii*, 2013).

Embora a cistoscopia vesical seja o “gold standard” na deteção de cancro da bexiga, é um método invasivo e relativamente dispendioso (Morgan e Clark, 2010). Porém, fornece informação importante sobre todas as características macroscópicas do tumor (localização, aparência, número e dimensão) e anomalias na mucosa. No caso de lesões neoplásicas planas (Tis) a sua deteção pode ser melhorada através da cistoscopia de fluorescência, já que a cistoscopia convencional pode levar a ressecções incompletas e maiores taxas de recorrência (Sharma *et alii*, 2009). Agentes fluorescentes permitem a visualização dos tecidos com metabolismo elevado e, portanto, melhoram a eficácia da ressecção dos carcinomas superficiais da bexiga (Zaak *et alii*, 2005). O mecanismo exato pelo qual estes agentes, instilados intravesicalmente, induzem a fluorescência macroscópica do tecido tumoral da bexiga, ainda é desconhecido (Jacobs *et alii*, 2010).

A citologia urinária é o método não-invasivo padrão para o diagnóstico ou monitorização do cancro da bexiga (Pashos *et alii*, 2002). Não requer preparação do paciente e é o marcador mais fiável na deteção de Tis, dada a sua elevada especificidade (95-100%) para identificar tumores da bexiga. Todavia, a citologia urinária apresenta baixa sensibilidade (66-79%) para detetar tumores de baixo grau e além do mais, depende da experiência do patologista (Babjuk *et alii*, 2013; Witjes *et alii*, 2013). Este facto limita a sua utilidade na deteção do cancro da bexiga em pessoas assintomáticas (Sharma *et alii*, 2009).

A tomografia computadorizada ou a ressonância magnética é recomendada no diagnóstico para estadiamento de doença localmente avançada ou metastática em pacientes nos quais tratamento radical está em consideração (Witjes *et alii*, 2013).

1.2.3 - Tratamento

O tratamento do cancro da bexiga deve ter como base a avaliação individual do paciente de risco e incluir uma abordagem multidisciplinar, envolvendo a urologia, patologia e oncologia. As opções de tratamento variam consoante o estágio da doença (Sharma *et alii*, 2009).

Tratamento de tumores não-músculo-invasivos

Tratamento de tumores papilares Ta e T1

O tratamento padrão segundo as guidelines da Associação Europeia de Urologia 2013 para os tumores papilares Ta e T1 da bexiga, é a erradicação macroscópica completa por RTU, incluindo parte do músculo subjacente (Babjuk *et alii*, 2013).

A RTU é um método de tratamento que serve também para confirmar um diagnóstico (Babjuk *et alii*, 2013). A ressecção transuretral é feita cistoscopicamente e implica a remoção do tumor com colheita do músculo adjacente ao tumor para avaliação histopatológica da profundidade de invasão (Sharma *et alii*, 2009). Este tipo de tratamento tem como objetivo tratar e prevenir a recorrência da doença e possível progressão para tumor músculo-invasivo, diminuindo a mortalidade específica por cancro (Jacobs *et alii*, 2010).

É de salientar que, deverá considerar-se a realização de uma segunda RTU se houver suspeita de que a ressecção inicial foi incompleta, por exemplo, na presença de tumores múltiplos ou volumosos, quando o patologista não refere tecido muscular na amostra ou quando é detetado um tumor de alto grau ou um tumor T1 (Miladi *et alii*, 2003 *cit. in* Babjuk *et alii*, 2013).

O insucesso no tratamento do carcinoma da bexiga não-invasivo é uma realidade, em alguns casos. Em todos os tumores T1 com risco elevado de progressão (tais como: alto grau, multifocalidade, existência de Tis, tamanho do tumor), a cistectomia radical imediata é uma opção (Sylvester *et alii*, 2006 *cit. in* Babjuk *et alii*, 2013). Em qualquer doente T1 com insucesso na terapêutica intravesical (ver adiante “Terapia adjuvante

intravesical de tumores não músculo-invasivos”), a cistectomia é uma alternativa (Fritsche *et alii*, 2010). Deve ser referido que, o atraso na cistectomia aumenta o risco de progressão e morte específica por cancro (Babjuk *et alii*, 2013).

Tratamento de tumores Tis - carcinoma “in situ”

O carcinoma *in situ* não pode ser erradicado por ressecção transuretral. Desta forma, tratamentos adicionais como imunoterapia BCG (Bacilo *Calmette-Guérin*) intravesical ou cistectomia radical poderão ser realizados. No entanto, não existe consenso sobre qual terapia deve ser feita, se conservadora (instilações de BCG intravesical) ou agressiva (cistectomia radical) (Babjuk *et alii*, 2013). Sabe-se que a resposta ao tratamento de Tis com BCG intravesical é superior a qualquer quimioterapia intravesical ou imunoterapia diferente, pois aumenta a taxa de resposta terapêutica e a percentagem de pacientes que permanecem livres de doença, e reduz o risco de progressão do tumor (Sylvester *et alii*, 2005). Relativamente à cistectomia radical, quando realizada de forma antecipada no momento de diagnóstico de Tis, fornece uma excelente sobrevida livre de doença, mas o tratamento excessivo ocorre em até 50% dos pacientes (Shariat *et alii*, 2006).

Terapia adjuvante intravesical de tumores não músculo-invasivos

Uma vez que existe um risco considerável de recorrência e/ou progressão dos tumores após ressecção transuretral, recomenda-se a terapêutica adjuvante intravesical para todos os estádios (Ta, T1 e Tis) (Babjuk *et alii*, 2013).

A realização da terapia intravesical adicional depende de fatores chave: a profundidade e o grau de invasão tumoral, a integralidade da ressecção, e a probabilidade estimada de recorrência e/ou progressão da doença (Jacobs *et alii*, 2010). Sabe-se que, os doentes com tumores múltiplos, tumores grandes (> 3 cm), e tumores altamente recidivantes (> 1 recidiva/ano) têm maior risco de recorrência, enquanto os doentes com tumores de estágio T1, tumores de alto grau, e Tis possuem maior risco de progressão. Sabe-se, ainda, que a quimioterapia intravesical reduz o risco de recorrências mas não o de progressão e está associada a efeitos secundários *minor* (Babjuk *et alii*, 2013). A mitomicina C (MMC) é o agente quimioterápico mais usado na terapia intravesical, devido ao seu alto peso molecular e por conseguinte, menor absorção sistémica e menores efeitos colaterais (Metts *et alii*, 2000).

Todavia, a imunoterapia BCG intravesical é eleita à quimioterapia intravesical na redução de recorrências e na prevenção ou atraso da progressão a carcinoma vesical músculo-invasivo (Malmstrom *et alii*, 2009). O bacilo *Calmette-Guérin* é o agente imunoterápico mais eficaz para pacientes com lesões Tis e T1. Este bacilo é uma estirpe atenuada da *Mycobacterium bovis* e é a forma mais comumente utilizada de imunoterapia intravesical (Sharma *et alii*, 2009). O seu mecanismo de ação continua a ser explorado, mas há fortes evidências de que, quando administrado intravesicalmente, é capaz de induzir uma resposta inflamatória direta junto do tumor (Metts *et alii*, 2000). A capacidade de estimulação do sistema imunitário pelo BCG tem demonstrado uma redução da progressão para doença invasiva e uma melhoria na sobrevivência global (Rozanski e Grossman, 1994). Contudo, a imunoterapia BCG intravesical tem um nível de toxicidade mais elevado que a quimioterapia intravesical (Babjuk *et alii*, 2013).

Tratamento de tumores músculo-invasivos

De acordo com as guidelines da Associação Europeia de Urologia 2013, a cistectomia radical é o tratamento curativo preferencial para o carcinoma da bexiga invasivo localizado (T2-T4a, N0-NX, M0). A linfadenectomia pélvica deverá ser parte integral da cistectomia, porém a extensão da dissecação ganglionar ainda não foi completamente definida (Witjes *et alii*, 2013).

Sabe-se que, na peça anatómica de cistectomia/linfadenectomia para avaliação histopatológica, o estado da margem cirúrgica e o número de nódulos linfáticos removidos na cirurgia são preditores da sobrevida pós-cistectomia e da recorrência local, sugerindo que a qualidade da cirurgia pode afetar os resultados (Herr *et alii*, 2004). Segundo os registos SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) há evidências de um aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global com um número crescente de nódulos linfáticos removidos (Jacobs *et alii*, 2010).

A cistectomia radical pode envolver a cistoprostatectomia nos homens e a histerectomia nas mulheres, seguida de derivação urinária (Sharma *et alii*, 2009). O íleo terminal e o cólon são os segmentos intestinais de escolha para a derivação urinária (Madersbacher e Studer, 2002).

Sabe-se que, a cistectomia radical causa importantes mudanças na vida dos pacientes ao nível das suas funções urinária e sexual, podendo, em alguns casos particulares, fazer-se

a preservação da bexiga (Metts *et alii*, 2000). A decisão sobre a preservação da bexiga ou cistectomia radical nos pacientes com tumores músculo-invasivos deve basear-se no estágio do tumor e comorbidades médicas (Maarouf *et alii*, 2011).

Nos doentes com tumores não operáveis localmente avançados (T4b), a cistectomia radical primária não é uma opção curativa. Se existirem sintomas, a cistectomia radical poderá ser uma opção terapêutica paliativa (Ok *et alii*, 2005). Nestes pacientes, podem ser usadas formas de derivação urinária intestinal ou não intestinal (ureteroenterostomia cutânea) com ou sem cistectomia paliativa (Witjes *et alii*, 2013). Os tratamentos com preservação da bexiga podem ser vários: radioterapia externa, quimioterapia ou tratamento multimodal (RTU, quimioterapia e radioterapia) (Rodel *et alii*, 2002).

Terapia neoadjuvante/adjuvante de tumores músculo-invasivos - Quimioterapia Perioperatória

O CUB tem uma alta taxa de resposta a vários esquemas de quimioterapia combinada tendo por base a cisplatina. Tais esquemas têm sido largamente usados em tumores músculo invasivos e a sua aplicação antes (neoadjuvante) ou após (adjuvante) a cistectomia melhora os índices de recidiva local e sobrevivência (Milowsky *et alii*, 2008).

Segundo as guidelines da Associação Europeia de Urologia 2013, a quimioterapia neoadjuvante combinada com cisplatina deve ser considerada no carcinoma da bexiga invasivo independentemente do tratamento definitivo (Witjes *et alii*, 2013). A quimioterapia neoadjuvante tem como vantagens: o tratamento de micrometástases; o potencial de retroceder o estadiamento com remoção tumoral total e redução de margens cirúrgicas positivas; a diminuição da implantação de células tumorais circulantes durante a cirurgia; e a possibilidade, em alguns casos, de preservação da bexiga. As desvantagens incluem o tratamento excessivo de alguns pacientes e o risco teórico de progressão do tumor até ao momento da cistectomia (Jacobs *et alii*, 2010). Na prática clínica atual, é difícil selecionar os pacientes que respondem com quimioterapia neoadjuvante, devido à falta de um teste aplicável (Witjes *et alii*, 2013). No futuro, espera-se que marcadores tumorais (capítulo II), numa definição de “medicina personalizada”, tornem mais fácil a seleção de pacientes para tratamento e a diferenciação entre os que respondem e os que não respondem.

Em contraste, a quimioterapia adjuvante apresenta como vantagens, a ausência de atrasos na realização da cistectomia e o tratamento contra apenas um pequeno volume de tumor. As desvantagens englobam a dificuldade de tolerância ao tratamento no período pós-operatório e o atraso do início da quimioterapia devido a possíveis complicações cirúrgicas (Jacobs *et alii*, 2010).

Ambas as quimioterapias, neoadjuvante e adjuvante, têm a desvantagem da toxicidade associada. Desta forma, o tratamento padrão para a maioria dos pacientes, devido à sua menor toxicidade, é a combinação entre gemcitabina e cisplatina (GC). A combinação entre metotrexato, vinblastina, adriamicina, e cisplatina (MVAC) possui uma eficácia comparável com GC, mas a toxicidade limita o seu uso (Sharma *et alii*, 2009).

Tratamento de tumores metastáticos

O cancro da bexiga metastático é uma doença, geralmente, incurável, sendo o seu tratamento apenas paliativo (Metts *et alii*, 2000). O prognóstico dos doentes não é bom, e o tempo médio de sobrevida é de 12-15 meses (Meluch *et alii*, 2001).

A quimioterapia é uma das opções no tratamento de tumores metastáticos. Planos de tratamento individuais são traçados consoante as diferenças de necessidade de cada doente (Jacobs *et alii*, 2010). Desta forma, o regime específico de quimioterapia vai depender das comorbidades médicas, como a disfunção renal e a cardíaca. A combinação comumente usada é GC ou um regime de multidroga com base na cisplatina (MVAC) (Sharma *et alii*, 2009).

Segundo as guidelines da Associação Europeia de Urologia 2013, sabe-se que a quimioterapia combinada contendo cisplatina permite alcançar uma sobrevida média de até 14 meses, com uma sobrevida livre de doença a longo prazo reportada em cerca de 15% dos doentes com invasão ganglionar. Por outro lado, a quimioterapia com agente único proporciona taxas de resposta baixas e normalmente de curta duração (Witjes *et alii*, 2013).

Apesar de todas estas modalidades de tratamentos, continua a haver doentes cujos tumores não respondem às terapêuticas escolhidas. Estes tumores, clinicamente, são iguais aos outros, mas biologicamente não o são. Torna-se, então, extremamente importante conseguir discriminar os que respondem às terapêuticas selecionadas dos que não respondem para poder adequar o tratamento mais eficaz a cada caso.

1.3 - Objetivos

➤ Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos biológicos subjacentes à progressão tumoral, especialmente no que se refere ao papel da glicosilação na evolução do carcinoma da bexiga. Assim, pretende-se identificar potenciais antígenos específicos das células malignas no carcinoma da bexiga passíveis de serem alvo de terapêuticas imunológicas.

➤ Objetivos específicos

Avaliar o padrão de expressão do antígeno glicosídico sialil Tn (STn) numa série de casos com CUB, correlacionando-o com os parâmetros clínico-patológicos em análise, de forma a contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento desta neoplasia, bem como na administração de medidas terapêuticas mais favoráveis e eficazes.

Verificar a imunoexpressão do antígeno sialil T - S6T no CUB, nos casos negativos para o STn.

Estudar a imunoexpressão da proteína Ki67 no CUB, e verificar a sua correlação com as variáveis clínico-patológicas em análise.

Correlacionar a sobrevida global no CUB com as variáveis estudadas.

II - Desenvolvimento

2.1 - Glicosilação aberrante e cancro

Apesar da grande variedade de fatores clínicos (grau, estágio tumoral, etc) que, normalmente, se correlacionam com a recorrência do tumor e prognóstico do doente, a previsão do comportamento de alguns tumores ainda permanece imprecisa (Rozanski e Grossman, 1994). O carcinoma urotelial da bexiga (CUB) continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade. A exposição ambiental a agentes cancerígenos e a resposta do hospedeiro a esses produtos químicos desempenham papéis fundamentais na prevalência desta doença (Colombel *et alii*, 2008). Durante a última década, vários avanços no diagnóstico e tratamento do cancro da bexiga foram realizados (ver capítulo anterior). No entanto, ainda há muitas questões importantes a serem respondidas quanto ao tratamento (Jacobs *et alii*, 2010). As observações clínicas e estudos moleculares mostram cada vez mais que os tumores papilares são fundamentalmente diferentes do Tis, apesar de ambos serem superficiais (Rozanski e Grossman, 1994). Há investigações a decorrer no âmbito das doenças superficiais para ajudar a prever que pacientes progridem para doença invasiva, e assim estabelecer a terapêutica ótima logo de início (Metts *et alii*, 2000).

A transformação maligna das células epiteliais está frequentemente associada com a alteração das vias de glicosilação (Danussi *et alii*, 2009). Todas as células são cobertas por cadeias de açúcar hidrofílicas (glicanos) ligadas a proteínas (glicoproteínas) ou lípidos (glicolípidos), que estão envolvidas na interação com o meio circundante (Figura 4). Estas interações podem ser de célula-célula ou célula-matriz extracelular (Tarp e Clausen, 2007).

"A expressão dos antígenos STn, S6T e do índice de proliferação Ki67 no carcinoma da bexiga"

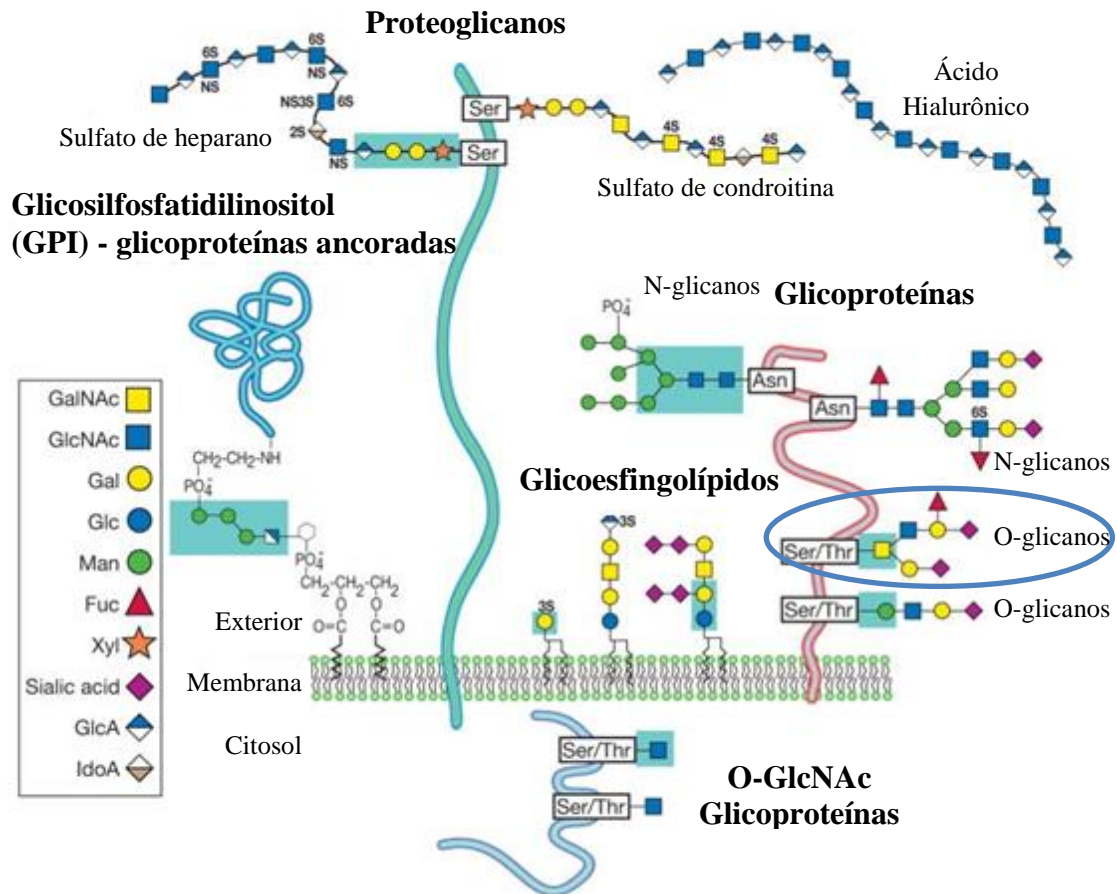


Figura 4 - Principais classes de hidratos de carbono animais. Adaptado da referência Rillahan e Paulson, 2011.

Há um perfil carbohidratado que é diferente comparando tecidos normais com tecidos tumorais (Ohyama, 2008). Desta forma, as células cancerígenas expressam glicanos, normalmente não expressos por células normais e podem, conseqüentemente, ser reconhecidas como células neoplásicas, pelas células do sistema imunitário (Tarp e Clausen, 2007).

Muitos antígenos associados a tumores e utilizados clinicamente para diagnóstico de carcinomas, são estruturas carbohidratadas que residem em glicolípido, mucinas e outras glicoproteínas (Ju *et alii*, 2008). Os intitulados antígenos carbohidratados associados a tumor (TACAs) são estruturas geradas durante a transformação neoplásica, a partir de alterações na expressão de múltiplos genes dentro das vias de glicosilação. Os TACAs provocam transformações fundamentais no crescimento, adesão e motilidade das células cancerígenas, que conduzem a alterações fenotípicas de invasão e metastização (Danussi *et alii*, 2009).

A detecção de TACAs (como marcadores tumorais) nas células do cancro da bexiga vem, desde há muito tempo, sendo alvo de investigação para auxiliar o diagnóstico, prognóstico e tratamento desta doença. Vários antígenos têm-se mostrado promissores como marcadores de prognóstico do carcinoma da bexiga (Rozanski e Grossman, 1994). O antígenos Tn e STn são dois dos TACAs mais comuns e encontram-se expressos em mais de 90% do carcinomas humanos (Danussi *et alii*, 2009). Estes antígenos são estruturas precursoras na cadeia glicosídica e resultam da síntese incompleta das cadeias *O*-glicanas em múltiplas glicoproteínas e mucinas, o que não acontece nas células normais, uma vez que a síntese continua, promovendo o alongamento da glicoproteína (Danussi *et alii*, 2009; Kakeji *et alii*, 1995). (Figura 5)

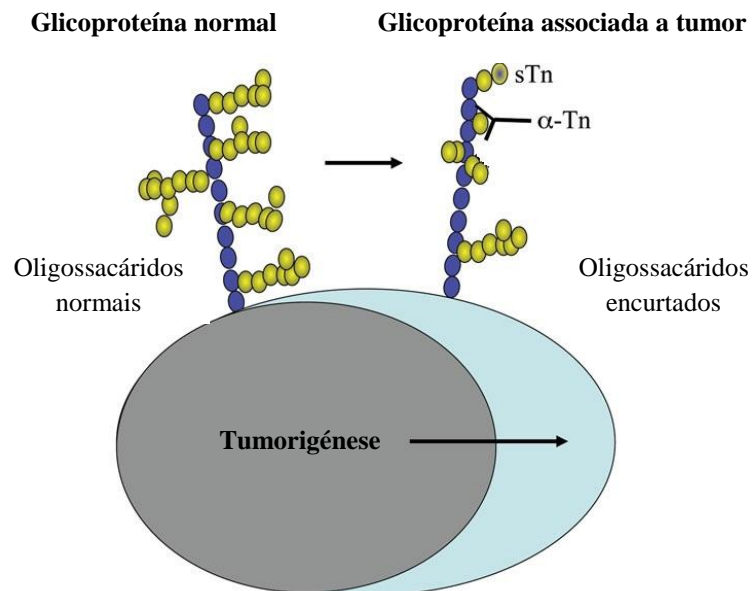


Figura 5 - Diferenças entre glicoproteínas normal (com oligossacáridos normais) e associada a tumor (com oligossacáridos encurtados). Adaptado da referência Madame Curie Bioscience Database.

A *O*-glicosilação é uma importante modificação pós-tradução que acontece em muitas glicoproteínas secretadas e de ligação à membrana celular (Tongzhong *et alii*, 2002). Os *O*-glicanos são sintetizados no retículo endoplasmático, complexo de golgi ou citosol consoante as etapas enzimáticas, por transferência de monossacarídeos. Os *O*-glicanos ligam-se aos grupos hidroxilo nos resíduos de serina e treonina e podem ser vários: *O*-GlcNAc, *O*-manose, *O*-fucose e *O*-GalNAc (Tarp e Clausen, 2007). Este último tipo de *O*-glicosilação (*N*-acetilgalactosamina), também designado por *O*-glicosilação do tipo mucina (Figura 6), é uma modificação comum em proteínas de mamíferos que ocorre

durante a via secretora (Pedersen *et alii*, 2011). Os *O*-glicanos do tipo mucina que se alongam a partir de GalNAc-*O*-Ser/Thr são sintetizados no complexo de Golgi, através da transferência gradual de açúcares a partir de doadores de nucleótidos para substratos aceitadores, por ação sequencial de glicosiltransferases. Conseqüentemente, pode formar-se uma série de *O*-glicanos, dependendo da disponibilidade e especificidade das glicosiltransferases presentes (Tongzhong *et alii*, 2002). Até agora, pelo menos oito diferentes *O*-glicanos têm sido descritos, sendo as estruturas dos *cores* 1 e 2 as mais comuns em glicoproteínas não-mucinas e dos *cores* 1-4 as mais frequentes em mucinas (Tarp e Clausen, 2007). (Figura 6)

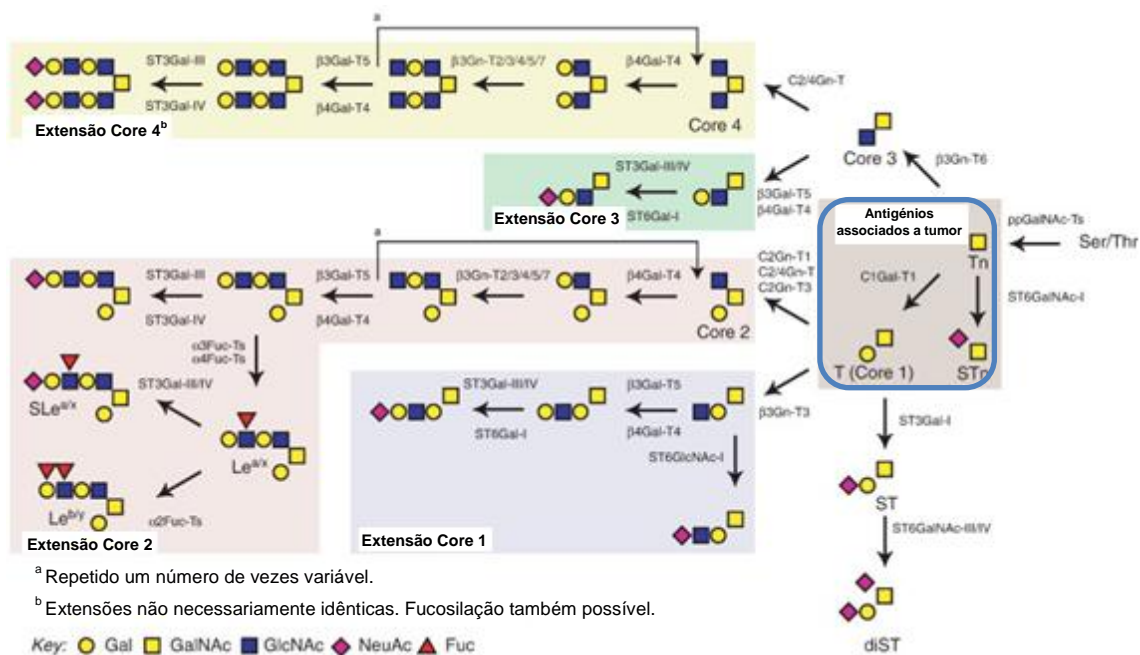


Figura 6 - Vias biossintéticas dos *O*-glicanos do tipo mucinas mais comuns. Adaptado da referência Tarp e Clausen, 2007.

Os *O*-glicanos podem afetar as propriedades estruturais e funcionais de péptidos ou proteínas de transporte, contudo, é o controle da *O*-glicosilação que permite manipular estas moléculas e alterar os seus efeitos biológicos (Tarp e Clausen, 2007). O primeiro passo de biossíntese de glicanos do tipo *O*-GalNAc é controlado por enzimas ppGalNAcT (polipéptidos *N*-acetilgalactosamina transferases), as quais determinam a densidade e locais de glicosilação por transferência de GalNAc para serinas e treoninas selecionadas (Hassan *et alii*, 2000). Este processo origina a formação do antígeno Tn (GalNAc-*O*-Ser/Thr). Uma vez sintetizado, o antígeno Tn pode ser novamente glicosilado pela adição de açúcares específicos, sob a ação de glicosiltransferases. Por

outro lado, a adição de ácido siálico (NeuAc – ácido acetilneuramínico) ao açúcar GalNAc forma o antígeno STn (NeuAc-GalNAc-O-Ser/Thr), produto final que não sofre nova glicosilação, pois o ácido siálico bloqueia o alongamento da cadeia (Júnior *et alii*, 2007). (Figura 6)

A O-glicosilação aberrante é uma das mais comuns modificações pós-tradução associadas ao cancro, formando um conjunto diversificado de estruturas moleculares encontrado na superfície das células cancerígenas, que não tem correspondência em células normais (Springer, 1984). Como resultado, o padrão específico de glicoproteínas encurtadas associadas ao cancro produz um novo tipo de epítomos de glicopéptidos (antígenos T, Tn e STn, entre outros) que podem ser detetados pelo sistema imunitário (Madsen *et alii*, 2012).

- Antígenos Thomsen-Friedenreich relacionados (Tn e STn)

O antígeno Tn foi descoberto em 1957 e designado “antígeno T nouvelle” ou Tn por Moreau *et alii*. O antígeno Tn é um precursor do antígeno Thomsen-Friedenreich, ou antígeno T, e está definido como um monossacarídeo de N-acetilgalactosamina ligado a um resíduo de serina ou treonina, GalNAc α 1-O-Ser/Thr (Molinaro *et alii*, 2011). (Figura 7)

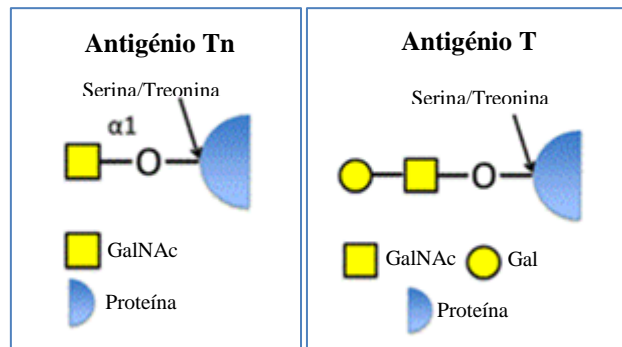


Figura 7 - Antígenos Tn e T. Adaptado da referência SBH Sciences.

O antígeno Tn é adicionado a uma cadeia polipeptídica através duma grande família enzimática de até 20 ppGalNAcT diferentes. Estas enzimas transferem a GalNAc a partir do dador de açúcar nucleotídico UDP-GalNAc para os resíduos de serina ou treonina (Hagen *et alii*, 2003).

O Tn é um biomarcador precoce de cancro, tanto em humanos como em modelos animais (Danussi *et alii*, 2009). Todavia, em tecidos normais não é detetado como um simples monossacarídeo, pois sofre glicosilações sucessivas através de diversas glicosiltransferases. Assim sendo, o antígeno Tn funciona como uma estrutura precursora básica em muitos *O*-glicanos extensos encontrados na maioria dos tecidos e mucinas fortemente glicosiladas (Brockhausen *et alii*, 2009).

O antígeno Tn (GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) é tipicamente alongado pela ação da enzima T-sintase β 1-3 galactosiltransferase) que adiciona galactose, utilizando o dador UDP-Gal para gerar o antígeno T, também conhecido como core 1 (Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) ou TF-Ag (Molinaro *et alii*, 2011).

O core 1, por sua vez, também serve como um precursor para *O*-glicanos mais complexos, ou pode ser também sialilado (Molinaro *et alii*, 2011). Esta sialilação pode ser feita através das enzimas α 2-3 ST3Gal-I/II/IV ou α 2-6 ST6GalNAc-I/II, que terminam a extensão da cadeia (Dall'Olio e Chiricolo, 2001). As α 2-3 ST3Gal-I, II e IV são conhecidas por promoverem a sialilação da posição *O*-3 do resíduo Gal, originando o antígeno S3T (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -*O*-Ser/Thr). As α 2-6 ST6GalNAc-I e II promovem a sialilação da posição *O*-6 do resíduo GalNAc, originando o antígeno S6T (Gal β 1-3 (Neu5Ac α 2-6) GalNAc α -*O*-Ser/Thr). A ação concertada de α 2-3 ST3Gal-I/II/IV e α 2-6 ST6GalNAc-I/II origina o antígeno di-sialilado T (DST) (Dall'Olio e Chiricolo, 2001; Wopereis *et alii*, 2006).

Estudos têm demonstrado que os antígenos T e Tn estão sobreexpressos nas células de carcinoma da bexiga, em comparação com as células normais onde a expressão é praticamente inexistente (Brockhausen, 1999; Videira *et alii*, 2009). Em particular, Limas 1991 avaliou, por imunohistoquímica, a expressão do antígeno T em 56 biopsias de carcinoma da bexiga de vários estádios. Este autor verificou que o antígeno T era característico dos estádios tumorais mais avançados e quase estava ausente nos urotélios normais. Por outro lado, Langkilde *et alii*, 1995 concluíram que havia uma correlação entre a expressão do antígeno T e a recorrência ou progressão de tumores uroteliais da bexiga não invasores ou que invadem a lâmina própria. Um outro estudo demonstrou que os antígenos T encriptados (sialil T - S6T, S3T e DST) estavam expressos normalmente nos tumores papilares superficiais da bexiga (Ta e T1). Os autores acrescentaram que a expressão do ST estava parcial ou completamente ausente nos

tumores que apresentavam progressão após recorrências frequentes (Yamada *et alii*, 1988). Sabe-se, também, que as enzimas α 2-6 ST6GalNAc-I/II por estarem envolvidas na formação do antígeno S6T podem estar sobreexpressas em tumores da bexiga. Contudo, outros fatores como a expressão reduzida de glicosiltransferases responsáveis pela extensão das cadeias e a alteração nas vias secretoras também podem contribuir para isso (Brockhausen, 1999; Reis *et alii*, 2010).

Por sua vez, a expressão do antígeno Tn pode resultar da falta de actividade da enzima T-sintase, que está sobre o controlo de uma chaperone molecular conhecida como Cosmc. Mutações adquiridas no gene *Cosmc* causam a perda da actividade T-sintase e, conseqüentemente, conduzem à expressão do antígeno Tn (Ju *et alii*, 2008). A sua expressão está correlacionada com o potencial metastático e mau prognóstico em muitos cancros, incluindo o cervical, adenocarcinoma do pulmão, carcinoma colo-retal, da mama e gástrico (Danussi *et alii*, 2009).

A β 1-3 N-acetilglucosaminiltransferase (β 1-3GlcNac-T) é outra enzima responsável pelas modificações no Tn. Esta adiciona GlcNAc ao antígeno Tn, formando o core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) com expressão restrita, sobretudo nos tecidos gastrointestinais (Iwai *et alii*, 2002). Sabe-se que níveis alterados desta enzima ou dos nucleótidos de açúcar utilizados por ela, podem causar a expressão do antígeno Tn. A diminuição destes níveis tem sido correlacionada com cancro do cólon (Molinaro *et alii*, 2011).

Além da enzima anteriormente referida, a ST6GalNAc-I pode adicionar NeuAc ao Tn, a partir do dador CMP-ácido siálico e formar o antígeno sialil Tn, igualmente conhecido como STn ou Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr (Kurosawa *et alii*, 2000). (Figura 8)

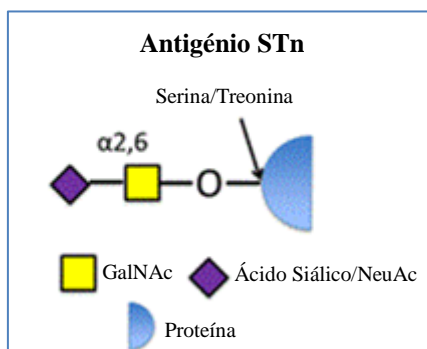


Figura 8 - Antígeno STn. Adaptado da referência SBH Sciences.

A biossíntese do STn resulta numa paragem da extensão dos *O*-glicanos e raramente se observa em tecidos normais (Marcos *et alii*, 2004). As células caliciformes do intestino delgado, as células parietais do estômago, as células *Leydig* testiculares, as células endometriais na fase secretora do ciclo menstrual, algumas células endoteliais (particularmente da mucosa gastrointestinal) e as células do tecido conjuntivo estão entre as poucas células do organismo que expressam STn (Ogata *et alii*, 2001). Este epítipo está altamente expresso na maioria dos carcinomas gástricos, colo-retal, do ovário, mama e pâncreas. Além disso, a sua expressão está associada à agressividade do carcinoma e mau prognóstico (Marcos *et alii*, 2004). A expressão do epítipo STn resulta de uma sobreexpressão da enzima ST6GalNAc-I (Molinaro *et alii*, 2011). Esta enzima compete com a T-sintase para promover a expressão do antígeno STn (Cazet *et alii*, 2010). Neste contexto, a expressão do antígeno Tn está, muitas vezes, associada com a expressão do antígeno STn (Ju *et alii*, 2008).

Em resumo, a formação de *O*-glicanos truncados, tais como os antígenos Tn e STn, pode resultar da alteração dos níveis de expressão de glicosiltransferases no complexo de Golgi, inativação de chaperones moleculares, bem como da modificação de disponibilidade do substrato dador e aceitador (Reis *et alii*, 2011; Dall'Olio e Chiricolo, 2001).

Os epítipos Tn e STn têm sido alvos de vários estudos na tentativa de definir a base molecular para a sua expressão. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos exatos que controlam a expressão destes epítipos (Xu *et alii*, 2005). Estudos anteriores demonstraram que a expressão dos TACAs resulta do metabolismo alterado das células tumorais, das alterações no microambiente tumoral e das consequentes alterações na expressão de múltiplos genes dentro das vias de glicosilação (Ju *et alii*, 2008). Sabe-se que a biossíntese de *O*-glicanos em proteínas é um processo complexo e regulado que envolve mais de 50 produtos de genes, a maioria glicosiltransferases (Reis *et alii*, 2011). Até agora, não tem havido nenhuma base genética ou bioquímica para a expressão dos antígenos Tn e STn em cancros humanos, porém, a sua presença pode ser detetada por diferentes reagentes, incluindo anticorpos e lectinas, que se ligam ao terminal GalNAc ou Neu5Ac (Ju *et alii*, 2008; Molinaro *et alii*, 2011).

Os antígenos Tn e STn são também, potenciais alvos para vacinas anti-tumorais. Em primeiro lugar, porque ocorrem em mais de 90% dos carcinomas humanos, incluindo

mama, cólon, pulmão, bexiga, colo do útero, ovário, estômago e próstata (Molinari *et alii*, 2011). Em segundo lugar, a sua expressão correlaciona-se com o pior prognóstico da doença e aumento do potencial metastático (Springer, 1989; Itzkowitz *et alii*, 1989). Em terceiro lugar, as alterações no glicocálice contribuem para as novas propriedades da célula em termos de adesão, invasão, entre outros. Por último, estes antígenos também não são encontrados na maioria dos tecidos normais (Desai, 2000). Por tudo isto, estes antígenos proporcionam alvos viáveis para o desenvolvimento de vacinas com base em TACAs (Morelli *et alii*, 2011). Vacinas terapêuticas derivadas de combinações entre antígeno carbohidratado e adjuvante são uma abordagem promissora para a imunoterapia do cancro (Galonić e Gin, 2007).

O tratamento do cancro através de vacinas baseadas em carboidratos totalmente sintéticos, baseia-se no facto de as células em transformação maligna exibirem frequentemente, à superfície celular, alterações significativas na natureza e quantidade de hidratos de carbono ligados a proteínas (Molinari *et alii*, 2011). Presume-se que, quando um antígeno sintético com base num carboidrato associado a tumor, é adequadamente introduzido no sistema imunitário, pode despoletar uma resposta imunológica. Esta resposta pode gerar uma produção de anticorpos que se ligam seletivamente aos antígenos sintéticos, eliminando-os, tal como às células tumorais que sobre-expressam os carboidratos em questão (Jeon *et alii*, 2009). No entanto, em doentes com cancro, muitos dos referidos antígenos carbohidratados estão realmente alterados mas, por razões pouco claras, o organismo não lhes reage imunologicamente (Slovin *et alii*, 2005). Assim sendo, quando estes antígenos associados a tumores são apresentados ao sistema imunitário como glicoconjugados sintéticos, anexados a moléculas de transporte imunogénicas (tais como a proteína transportadora *keyhole limpet hemocyanin* - KLH) e co-administrados com um adjuvante imunológico (como o QS21), pode ser induzida uma resposta com anticorpos específicos de carboidratos (Jeon *et alii*, 2009).

O Tn é um potencial alvo para o diagnóstico precoce e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em doenças neoplásicas (Molinari *et alii*, 2011). A utilização de vacinas dirigidas para o antígeno Tn já foi avaliada em cancro da mama com resultados promissores. Nesse estudo verificou-se que um número de anticorpos anti-Tn IgG/IgM foram gerados, tendo sido relatadas as suas atividades anti-tumorais. Constatou-se que estes anticorpos foram capazes de inibir a adesão das células

neoplásicas às células endoteliais linfáticas, impedindo, assim, a metastização (Danussi *et alii*, 2009).

O STn é, também, um alvo promissor para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas (Slovin *et alii*, 2005). A vacina anti-tumoral Theratope é administrada para o antígeno STn. O STn sintético é conjugado com KLH para estimular a produção de anticorpos e ativação de células T (Disis, 2006) Os primeiros ensaios clínicos com imunizações derivadas de combinações entre STn, KLH e QS21 foram em pacientes com carcinoma colorretal tendo-se obtido bons resultados. As vacinas foram bem toleradas e anticorpos IgG/IgM reativos foram induzidos em grandes quantidades contra os respectivos antígenos (Gilewski *et alii*, 2007). Outros estudos semelhantes, em pacientes com cancro da mama, também, têm mostrado evidências de resposta imune (Slovin *et alii*, 2005).

2.2 - Índice de proliferação (Ki67) e cancro

A proliferação descontrolada das células é considerada um dos mecanismos biológicos mais importantes associados com a oncogénese. O Ki67 é uma proteína nuclear não-histona expressa por células em proliferação durante as fases do ciclo celular G1, S, G2/M (Enache *et alii*, 2012). Assim sendo, não está presente na fase G0 (células quiescentes) (Burger *et alii*, 2007).

A previsão do comportamento do cancro tem sido, desde sempre, uma tarefa importante, no que respeita ao tratamento do CUB. O anticorpo monoclonal Ki67 é relatado como um bom marcador da atividade proliferativa em vários tumores (Stavropoulos *et alii*, 1993). O crescimento potencial de tumores é um indicador importante da sua agressividade (Enache *et alii*, 2012). Diferenças estatisticamente significativas nos valores Ki67 são encontradas entre o urotélio normal e o CUB, bem como entre diferentes graus e estádios do tumor (Stavropoulos *et alii*, 1993). A expressão do Ki67 está claramente associada com o alto grau do tumor, estágio avançado e comprometimento dos nódulos linfáticos e metástases linfáticas. Naturalmente, o Ki67 é um preditor de recorrência, progressão e resposta ao tratamento para carcinoma urotelial invasivo (Stepan *et alii*, 2011).

Em suma, o Ki67 reconhece células na fase ativa do ciclo celular e, no caso do CUB tem um significado especial, no sentido de uma avaliação de prognóstico (Stepan *et alii*, 2011).

Neste estudo avaliou-se a expressão dos antígenos STn, S6T e Ki67 no CUB de vários graus e estádios, correlacionando com vários parâmetros clinicopatológicos.

2.3 - Material e Métodos

2.3.1 - População e variáveis em estudo

Este estudo englobou uma amostra de 96 casos, registrados e diagnosticados como carcinomas uroteliais da bexiga, no serviço de Anatomia Patológica, do Instituto Português de Oncologia do Porto – Francisco Gentil (IPOPFG-EPE), durante o período entre 2003 e 2007. Os casos com CUB foram selecionados com base na existência de dados de *follow-up* adequados e disponibilidade de blocos de tecidos incluídos em parafina. O bom estado de conservação dos blocos de parafina e a quantidade suficiente de material incluído para a realização dos cortes histológicos necessários, foram critérios de inclusão na seleção da amostra.

A série de trabalho inclui casos de tumores vesicais removidos por RTU ou cistectomia radical, assim como gânglios linfáticos removidos por linfadenectomia associada à cistectomia radical (quando aconselhável clinicamente). Dos 96 casos estudados, em 30 casos foram isolados gânglios linfáticos, dos quais 11 apresentavam metástases ganglionares.

Com o intuito de avaliar a expressão dos antígenos carbohidratados STn, S6T e proteína Ki67 no CUB, estudou-se a imunorreatividade dos tumores (com os anticorpos TKH₂, TKH₂ com β -(1-3)-Galactosidase e MIB-1, respetivamente), no sentido de relacionar a informação com os parâmetros clínico-patológicos clássicos (Tabela 4), Além das correlações supracitadas, relacionou-se a expressão dos antígenos glicosídicos STn e S6T com o índice proliferativo.

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

A sobrevivência global (período compreendido entre a data do diagnóstico e a morte por cancro ou a última consulta de *follow-up*) foi avaliada nos CUB, em função da expressão do antígeno STn, do índice de proliferação Ki67 e dos parâmetros clínico-patológicos (grau de diferenciação e estágio tumoral).

Tabela 4 - Parâmetros clínico-patológicos da amostra estudada ($n=96$ casos).

Parâmetros Clínico-Patológicos	
Idade, anos	
Mediana [min – máx]	69,50 [38-92]
Género, n (%)	
Masculino	82 (85,4)
Feminino	14 (14,6)
Gânglios metastizados, n (%)	
Não	19 (19,8)
Sim	11 (11,5)
Não isolados	66 (68,8)
Estádio tumoral, n (%)	
Ta	27 (28,1)
T1	20 (20,8)
T2	9 (9,4)
T3	20 (20,8)
T4	20 (20,8)
Grau de diferenciação, n (%)	
Baixo Grau	16 (16,7)
Alto Grau	80 (83,3)
Tipo de cirurgia, n (%)	
RTU	32 (33,3)
Cistectomia	64 (66,7)
Tipo de tumor, n (%)	
Primário	54 (56,3)
Recidiva	42 (43,8)
Follow-up, n (%)	
Vivo, perdido, morte por outras causas	67 (69,8)
Morte por cancro	29 (30,2)

2.3.2 - Estudo imunohistoquímico

Dos blocos de tecidos incluídos em parafina, realizaram-se cortes histológicos de 3µm de espessura, que se estenderam em lâminas de vidro adesivadas com APES 3-aminopriltório-silano (Sigma Chemical Co.). Foi avaliada a expressão do antígeno carboidratado STn, proteína Ki67 e, em 39 casos, do S6T. O estudo da imunorreatividade foi efetuado pelo método de Streptavidina-Biotina. As condições e soluções específicas para as diferentes técnicas de imunohistoquímica (ver anexo) seguiram as instruções do fornecedor e testes realizados no laboratório. Após a desparafinação e hidratação dos cortes histológicos, procedeu-se ao bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogénio a 3% e de seguida, à recuperação antigénica pelo calor com tampão citrato a pH 6. Posteriormente, fez-se uma incubação com soro normal UltraV Block, e logo depois com os respetivos soros primários: STn (hibridoma TKH₂, 1:20) e Ki67 (Mib-1, 1:100), overnight, a 4°C. Foi feita uma incubação com soro secundário biotinilado e com a streptavidina com peroxidase. O cromogénio utilizado na revelação foi a 3,3-diaminobenzidina (DAB) e o contraste nuclear foi realizado com a hematoxilina de Harris.

Realizaram cortes histológicos nos 39 casos STn negativos para avaliar a expressão do antígeno T encriptado (sialil T - S6T). O estudo da imunorreatividade foi efetuado pelo mesmo método. Para avaliar a expressão do antígeno S6T com o anticorpo primário TKH₂ foi efetuado um tratamento enzimático prévio nos tecidos com β-(1-3)-Galactosidase da *Xanthomonas campestris* (R&D systems). Esta enzima remove a ligação O-3 do resíduo Gal, expondo o antígeno STn.

Foram usados como controlos positivos, tecidos com imunorreatividade conhecida para os anticorpos em estudo. A metodologia usada no controlo negativo consistiu na substituição dos anticorpos primários, respetivos, por BSA 5% (Merck).

2.3.3 - Avaliação e quantificação da imunorreatividade

A imunorreatividade dos anticorpos monoclonais foi avaliada através da visualização dos cortes histológicos por microscopia óptica. Cada corte foi observado, independentemente, por dois observadores.

A imunexpressão dos antígenos S6T e STn foi contabilizada da seguinte forma para todos os parâmetros clinico-patológicos:

- Marcação membranar e/ou citoplasmática negativa (< 5% de células marcadas);
- Marcação membranar e/ou citoplasmática positiva (\geq 5% de células marcadas, tendo sido contabilizada a marcação celular pontual – *scatter*, ou em mancha).

A imunexpressão do antígeno STn foi contabilizada do seguinte modo na relação com os gânglios metastizados, índice de proliferação Ki67 e na sobrevida global:

- Marcação membranar e/ou citoplasmática negativa (< 10% de células marcadas);
- Marcação membranar e/ou citoplasmática positiva (\geq 10% de células marcadas, tendo sido contabilizada a marcação celular pontual – *scatter*, ou em mancha).

Na imunexpressão da proteína Ki67, consideraram-se como positivos os casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%, de acordo com os critérios utilizados por Santos *et alii*, 2003.

2.3.4 - Análise estatística

Os resultados foram apresentados em tabelas de frequências absolutas e percentagens. A análise univariada foi efetuada pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ou pelo teste exato de Fisher quando apropriado. A sobrevivência global foi analisada pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças das curvas encontradas foram estudadas pelo teste de Log-Rank ou pelo teste de Breslow, quando apropriado. Para o estudo estatístico utilizou-se o programa específico *SPSS 21.0® (Statistical Package for Social Sciences)* para Windows. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

2.4 - Resultados

2.4.1 - Grau de diferenciação e estágio tumoral

A amostra apresentada neste estudo compreende 96 carcinomas uroteliais da bexiga, 16 dos quais são de baixo grau (15 Ta e 1 T1) e 80 de alto grau (12 Ta; 19 T1; 9 T2; 20 T3; 20 T4; tabela 5). Verifica-se que há uma correlação estatisticamente significativa entre grau e estágio tumoral ($p < 0,001$), sendo que todos os tumores uroteliais de baixo grau ($n=16$) são não-músculo-invasivos (estádios Ta e T1).

Tabela 5 - Grau de diferenciação e estágio dos carcinomas uroteliais da bexiga estudados.

Grau de diferenciação	Estádio					p
	Ta	T1	T2	T3	T4	
Baixo grau	15 (93,8%)	1 (6,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,000
Alto grau	12 (15,0%)	19 (23,8%)	9 (11,3%)	20 (25,0%)	20 (25,0%)	

2.4.2 - STn e parâmetros clínico-patológicos estudados

Em relação ao STn e grau de diferenciação, verifica-se que dos 16 tumores uroteliais de baixo grau, 68,8% são STn negativos e dos 80 tumores de alto grau, a maioria (65,0%) são STn positivos (p=0,012; tabela 6; figuras 9 e 10).

Tabela 6 - Expressão do antígeno carbohidratado STn segundo o grau de diferenciação tumoral.

Grau de diferenciação	STn		p
	Negativo	Positivo	
Baixo grau	11 (68,8%)	5 (31,3%)	0,012
Alto grau	28 (35,0%)	52 (65,0%)	

Nota: A imunexpressão do antígeno STn foi considerada como negativa (com *cut-off*<5%) e positiva (com *cut-off*≥5%).

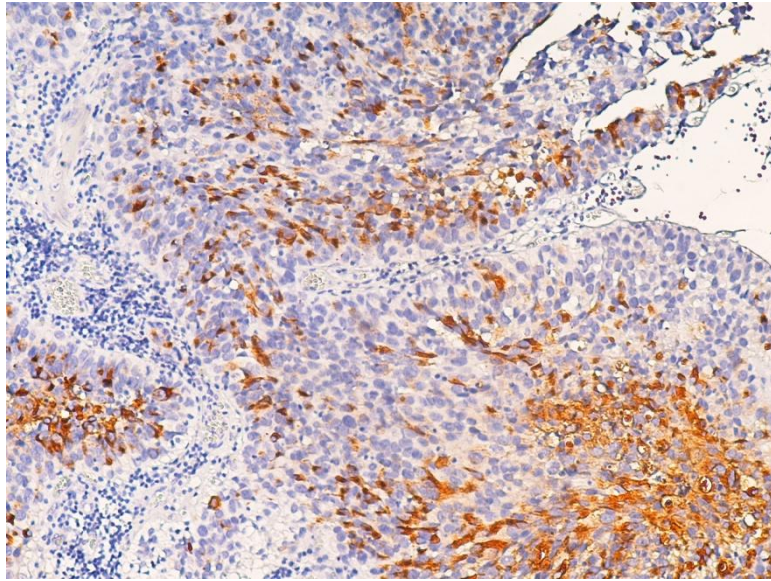


Figura 9 - Imunoexpressão STn positiva, 10x

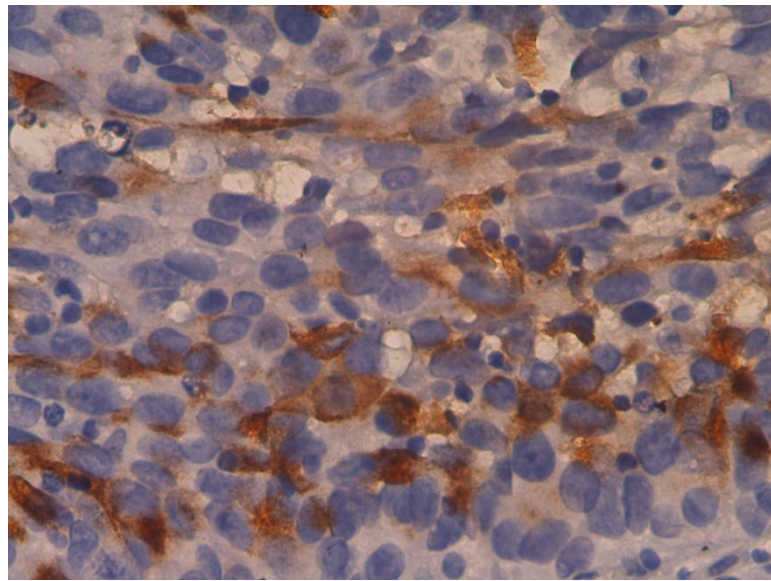


Figura 10 - Imunoexpressão STn positiva, 40x

Quando testada a associação entre o antígeno STn e o estágio tumoral (tabela 7), constatou-se que há uma correlação estatisticamente significativa ($p=0,001$). A maior parte dos carcinomas uroteliais no estágio Ta são negativos para o STn (70,4%) e a maioria dos tumores nos estádios T1, T2, T3 e T4 são positivos para o STn (60,0%; 88,9%; 85,0%; 60,0%, respectivamente).

Tabela 7 - Expressão do antígeno carbohidratado STn segundo o estágio tumoral.

Estádio	STn		p
	Negativo	Positivo	
Ta	19 (70,4%)	8 (29,6%)	0,001
T1	8 (40,0%)	12 (60,0%)	
T2	1 (11,1%)	8 (88,9%)	
T3	3 (15,0%)	17 (85,0%)	
T4	8 (40,0%)	12 (60,0%)	

Nota: A imunexpressão do antígeno STn foi considerada como negativa (com *cut-off*<5%) e positiva (com *cut-off*≥5%).

Na tabela 8 estão representados os resultados referentes à associação entre o antígeno STn e a morte por cancro. Vinte e dois (75,9%) dos 29 doentes que morreram por cancro tinham imunexpressão STn positiva. Em contraste, 32 (82,1%) dos 39 casos negativos para STn estavam vivos à data da última observação ou morreram por outras causas que não cancro ($p=0,030$).

Tabela 8 - STn e morte por cancro.

Follow-up	STn		p
	Negativo	Positivo	
Vivo, perdido, morte não por cancro	32 (47,8%)	35 (52,2%)	0,030
Morte por cancro	7 (24,1%)	22 (75,9%)	

Nota: A imunexpressão do antígeno STn foi considerada como negativa (com *cut-off*<5%) e positiva (com *cut-off*≥5%).

O estudo da relação entre o padrão de expressão do antígeno glicosídico STn e as variáveis clínico-patológicas (tipo de tumor - primário/recidiva - e gânglios metastizados) foi, também, verificado. A relação STn/tipo de tumor não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,099$), no entanto, a maior parte dos tumores primários (66,7%) são STn positivos. Relativamente ao STn/gânglios metastizados, dos

30 casos nos quais foram isolados gânglios, 17/19 casos sem metástases ganglionares eram negativos para o STn, enquanto que 5 dos 7 casos STn positivos apresentavam metástases ganglionares ($p = 0,043$; tabela 9).

Tabela 9 - STn e gânglios metastizados.

Gânglios metastizados	STn		p
	Negativo	Positivo	
Não	17 (89,5%)	2 (10,5%)	0,043
Sim	6 (54,5%)	5 (45,5%)	

Nota: A imunexpressão do antígeno STn foi considerada como negativa (com *cut-off*<10%) e positiva (com *cut-off*≥10%). O *cut-off* de 5% não se demonstrou estatisticamente significativo nesta associação.

2.4.3 - STn e índice de proliferação Ki67

Relativamente à associação entre o antígeno STn e o índice de proliferação Ki67 (tabela 10), dos 73 casos STn negativos, 51 (69,9%) são também Ki67 negativos. Também, 56,5% dos STn positivos são igualmente Ki67 positivos ($p=0,022$).

Tabela 10 - STn e índice de proliferação Ki67.

Ki67	STn		p
	Negativo	Positivo	
Negativo	51 (69,9%)	10 (43,5%)	0,022
Positivo	22 (30,1%)	13 (56,5%)	

Nota 1: A imunexpressão do antígeno STn foi considerada como negativa (com *cut-off*<10%) e positiva (com *cut-off*≥10%). O *cut-off* de 5% não se demonstrou estatisticamente significativo nesta associação.

Nota 2: A imunexpressão da proteína Ki67 foi considerada como positiva nos casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%.

Dos 39 casos STn negativos usados para avaliar a expressão do antígeno T encriptado (sialil T – S6T), 29 eram positivos para o S6T. Todavia, não existe correlação com significado estatístico quando se compara o índice de proliferação Ki67 e o S6T. Segundo a leitura da tabela 11, dos 12 casos Ki67 positivos, 8 (67,0%) são também S6T positivos.

Tabela 11 - Ki67 e S6T.

S6T	KI67		p
	Negativo	Positivo	
Negativo	6 (60,0%)	4 (40,0%)	0,360
Positivo	21 (72,4%)	8 (27,6%)	

Nota 1: A imunexpressão do antígeno S6T foi considerada como negativa (com *cut-off*<5%) e positiva (com *cut-off*≥5%).

Nota 2: A imunexpressão da proteína Ki67 foi considerada como positiva nos casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%.

Quando se junta os resultados do STn aos do S6T, não se obtém nenhuma variável discriminatória em relação às variáveis clínico-patológicas. No entanto, e de acordo com a leitura da tabela 12, dos 10 casos STnS6T negativos, 6 (60,0%) são também Ki67 negativos. Dos 35 casos Ki67 positivos, 31 (89,0%) são igualmente STnS6T positivos.

Tabela 12 - Ki67 e STnS6T

STnS6T	Ki67		p
	Negativo	Positivo	
Negativo	6 (60,0%)	4 (40,0%)	0,530
Positivo	55 (64,0%)	31 (36,0%)	

Nota 1: A imunexpressão do antígeno STnS6T foi considerada como negativa (com *cut-off*<5%) e positiva (com *cut-off*≥5%).

Nota 2: A imunexpressão da proteína Ki67 foi considerada como positiva nos casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%.

2.4.4 - Índice de proliferação Ki67 e parâmetros clínico-patológicos estudados

A relação grau de diferenciação/Ki67 (tabela 13) não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,089$), no entanto, observou-se que dos 16 tumores de baixo grau, 13 81,3% eram Ki67 negativos e dos 35 Ki67 positivos, 32 eram de alto grau. (Figuras 11 e 12)

Tabela 13 - Expressão do índice de proliferação Ki67 segundo o grau de diferenciação tumoral.

Grau de diferenciação	Ki67		p
	Negativo	Positivo	
Baixo grau	13 (81,3%)	3 (18,8%)	0,089
Alto grau	48 (60,0%)	32 (40,0%)	

Nota: A imunoposição da proteína Ki67 foi considerada como positiva nos casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%.

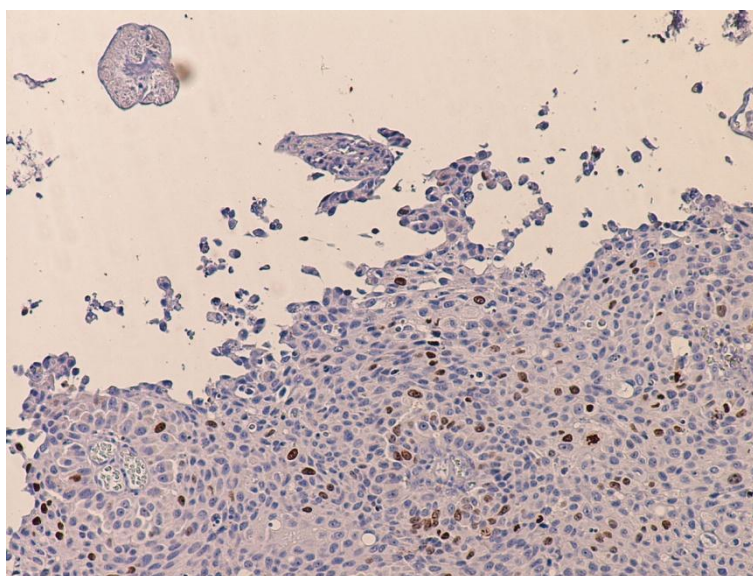


Figura 11 - Imunoexpressão Ki67 positiva, 10x

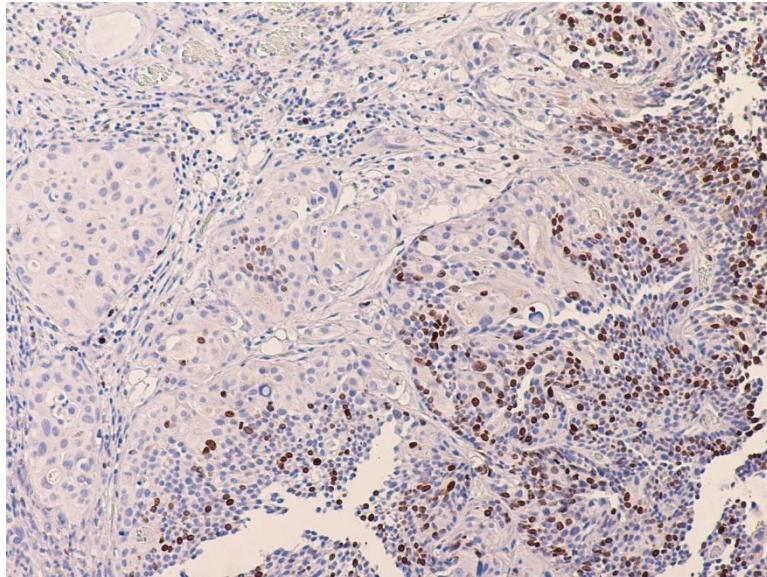


Figura 12 - Imunoexpressão Ki67 positiva, 10x

No que respeita ao estágio, quando considerada a invasão tumoral na sua totalidade (Ta, T1, T2, T3 e T4), não se verifica relação estatística com o índice de proliferação Ki67. Contudo, quando se considera o grupo dos superficiais *versus* o grupo dos invasores (tabela 14), observa-se que 20 (57,1%) dos 35 tumores Ki67 positivos invadem a camada muscular, enquanto mais de metade dos tumores Ki67 negativos (52,5%) são superficiais.

Tabela 14 - Expressão do índice de proliferação Ki67 segundo o agrupamento de estádios.

Agrupamento de estádios	Ki67		p
	Negativo	Positivo	
T. não-músculo-invasivo (Ta,T1)	32 (52,5%)	15 (42,9%)	0,365
T. músculo-invasivo (T2,T3,T4)	29 (47,5%)	20 (57,1%)	

Nota: A imunoexpressão da proteína Ki67 foi considerada como positiva nos casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%.

Quando se considera o tipo de tumor (tabela 15), verifica-se que 34 das 42 recidivas são não proliferativas e que a maioria dos tumores proliferativos (77,1%) é primária (p=0,002).

Tabela 15 - Expressão do índice de proliferação Ki67 segundo o tipo de tumor.

Tipo de tumor	Ki67		p
	Negativo	Positivo	
Primário	27 (44,3%)	27 (77,1%)	0,002
Recidiva	34 (55,7%)	8 (22,9%)	

Nota: A imunexpressão da proteína Ki67 foi considerada como positiva nos casos em que a percentagem de núcleos marcados era superior a 18%.

O estudo da relação entre o padrão de expressão do índice de proliferação Ki67 e as variáveis clínico-patológicas (gânglios metastizados e morte por cancro) foi, também, analisado. Não se verificou nenhuma relação entre o índice proliferativo e a metastização ganglionar. A relação Ki67/gânglios metastizados não se mostrou estatisticamente significativa, porém 11 (57,9%) dos 19 tumores com gânglios não metastizados são Ki67 negativos. Relativamente à associação entre o índice de proliferação Ki67 e a morte por cancro, também, não há correlação com significado estatístico (p=0,567). No entanto, verificou-se que, dos 61 casos Ki67 negativos, 43 ainda estavam vivos ou teriam morrido por outras causas que não cancro à data do último *follow-up*.

2.4.5 - Sobrevida global

Em relação à sobrevida global, o *cut-off* utilizado para a imunexpressão do antígeno STn assumiu valores positivos $\geq 10\%$ e negativos $< 10\%$ (o *cut-off* dos 5% de marcação não se mostrou significativo). Após a análise da figura 13, observa-se que a sobrevida global diminui mais rapidamente nos doentes STn positivos do que nos doentes STn negativos, sendo esta diferença estatisticamente significativa (p=0,034).

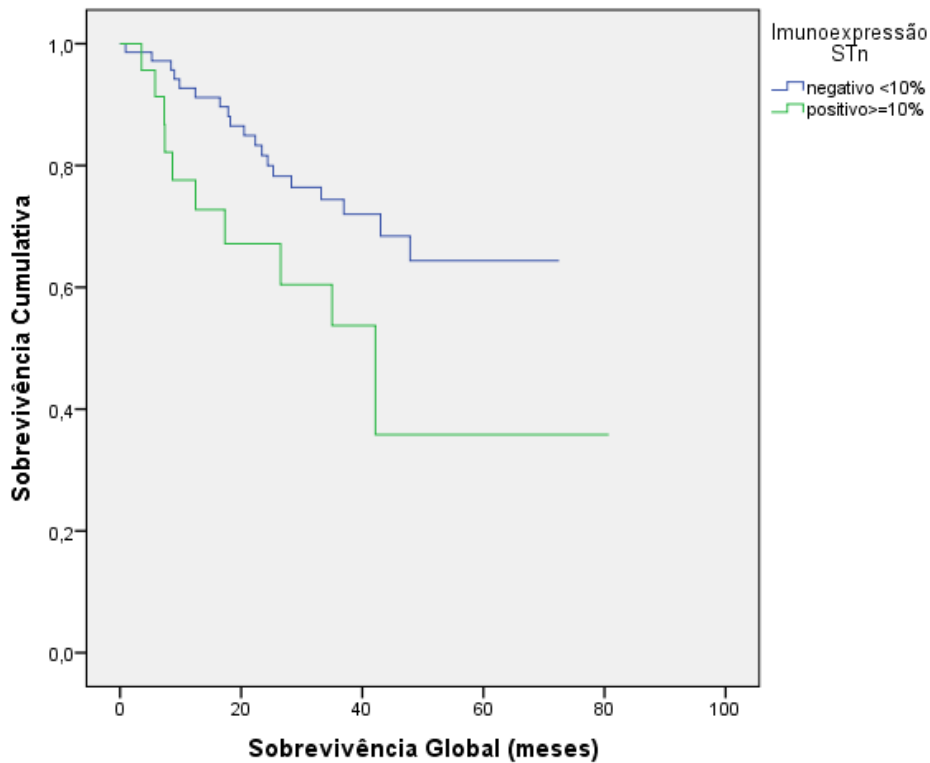


Figura 13 - Sobrevida global em função do antígeno STn.

A análise da sobrevida global em função dos parâmetros clinico-patológicos estágio tumoral e grau de diferenciação está representada nas figuras 14 e 15, respectivamente. Considerando o estágio tumoral, verifica-se que o grupo dos superficiais (Ta e T1) tem uma sobrevida significativamente maior do que o grupo dos invasores ($p=0,000$). Em relação ao grau de diferenciação também se verifica que os tumores mais indiferenciados são os que têm a sobrevida global inferior ($p=0,008$).

"A expressão dos antígenos STn, S6T e do índice de proliferação Ki67 no carcinoma da bexiga"

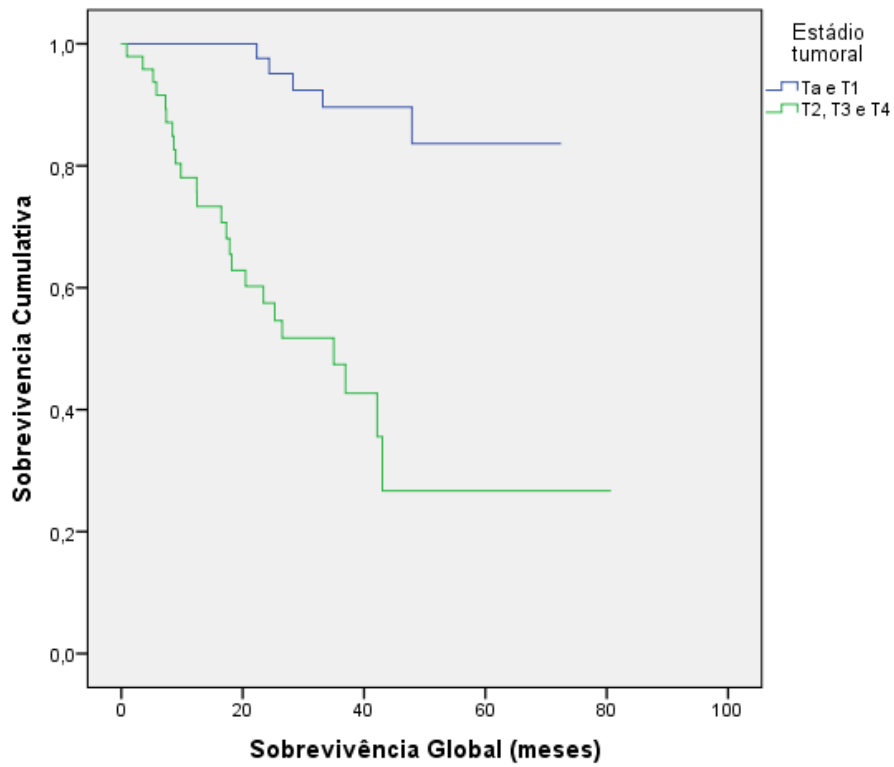


Figura 14 - Sobrevida global em função do estágio tumoral.

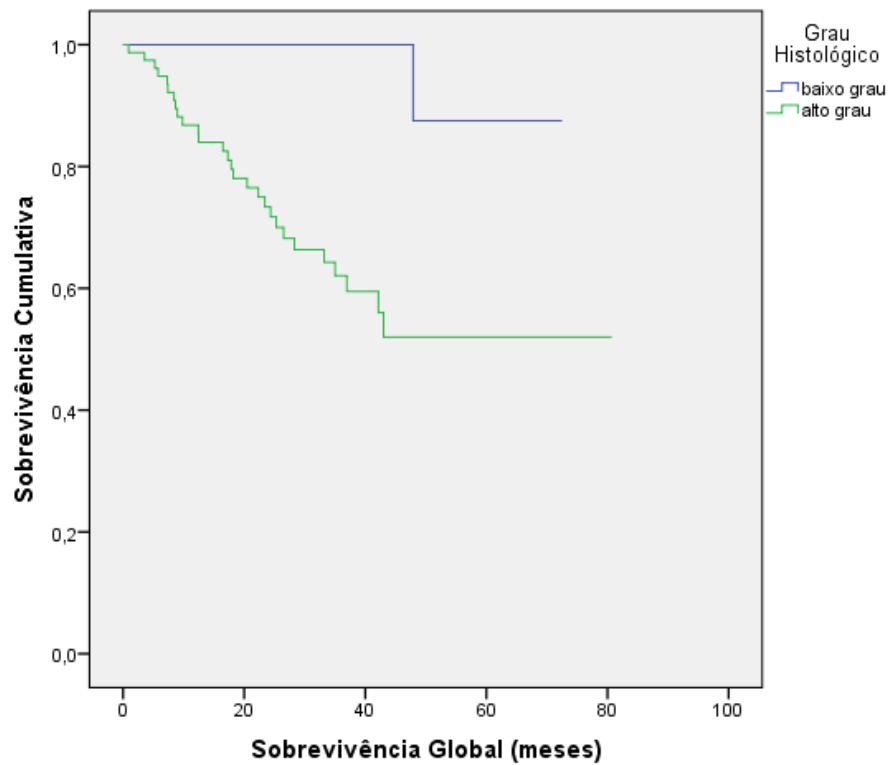


Figura 15 - Sobrevida global em função do grau histológico.

Em relação ao Ki67, após análise estatística não se verificaram diferenças significativas entre os tumores com expressão positiva e os tumores com expressão negativa ($p=0,160$). No entanto, verifica-se uma tendência para uma menor sobrevida global nos doentes Ki67 positivos (figura 16).

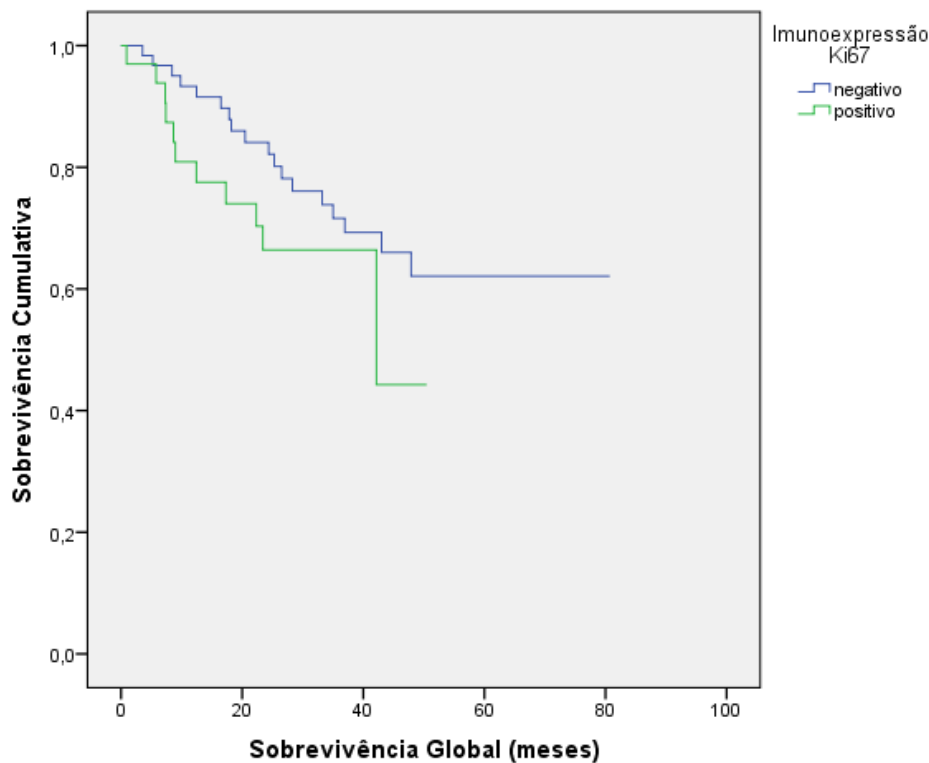


Figura 16 - Sobrevida global em função do índice de proliferação Ki67.

2.5 - Discussão

A falta de marcadores tumorais com especificidade e sensibilidade para deteção precoce do cancro, está conduzindo a uma procura de novas abordagens para identificação de biomarcadores (Peracaula *et alii*, 2008). Alterações no padrão de glicosilação são características universais da transformação maligna, que as torna importantes biomarcadores do cancro. Muitos dos biomarcadores utilizados na prática clínica corrente, tanto em amostras tecidulares como em soro, baseiam-se nas modificações de carboidratos (Reis *et alii*, 2010). A sobreexpressão ou a perda de expressão de vários antígenos carboidratados na superfície das células tumorais tem sido associada a um

fenótipo metastático e baixa sobrevida em carcinomas de diferentes origens (Davidson *et alii*, 2010).

A amostra estudada neste trabalho compreende casos de 96 doentes com CUB, de vários graus e estádios. O seu comportamento em termos clínico-patológicos está de acordo com o descrito para este tipo de tumores, ou seja, segundo a OMS os tumores invasores e de alto grau têm um pior prognóstico do que os tumores superficiais e de baixo grau. Este facto é observado claramente quando se correlaciona a sobrevida global com o estádio tumoral ($p=0,000$) e, também, quando se correlaciona a mesma sobrevida com o grau de diferenciação ($p=0,008$).

Nesta amostra foi estudada a expressão do antigénio glicosídico STn, tendo-se verificado uma associação clara entre a imunorreatividade do STn e o alto grau de diferenciação celular ($p=0,012$). Soares *et alii*, 1996 revelaram a mesma associação em estudos no carcinoma da mama invasivo. O mesmo foi observado por Semczuk *et alii*, 2002 no cancro do endométrio.

Em relação à profundidade de invasão, também, foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão do STn e o estádio tumoral avançado ($p=0,001$). Estes resultados são sobreponíveis aos encontrados por outros autores. Yamada *et alii*, 1995 relataram que a expressão do STn, no cancro gástrico avançado, pareceu estar relacionada com o estádio tumoral e presença de gânglios metastizados.

A sobreexpressão do antigénio glicosídico STn foi descrita em muitos tumores epiteliais, tendo maior frequência no do pâncreas, colorretal e ovário. O STn foi, portanto, considerado como um bom marcador tumoral da carcinogénese e potencialmente útil para o diagnóstico (Julien *et alii*, 2012). A sobreexpressão deste antigénio pode dever-se a vários fatores, sendo o mais importante a sobreexpressão da enzima ST6GalNac-I (Clément *et alii*, 2004). Vários estudos têm revelado uma correlação entre o STn e certas características clínico-patológicas em diferentes tipos de cancro, e que o STn pode ser um fator de prognóstico independente (Yamada *et alii*, 1995). No entanto, há ainda alguns resultados contraditórios, podendo muitos parâmetros ser responsáveis pela alta variabilidade de resultados indicados por diferentes autores. Entre esses parâmetros estão: a utilização de anticorpos distintos, diferentes metodologias de marcação, o tamanho da coorte das amostras e a

heterogeneidade dos subtipos de cancro incluídos nos respetivos estudos (Julien *et alii*, 2012).

No presente estudo sabe-se ainda que, a maioria dos doentes que morreram por cancro tinha expressão STn positiva. Estudos relativos ao cancro gástrico avançado, também, referiram que a sobrevida estimada em cinco anos nos casos avançados foi significativamente melhor nos doentes com expressão STn negativa do que naqueles com expressão STn positiva (Yamada *et alii*, 1995).

Relativamente ao tipo de tumor (primário/recidiva), não se estabeleceu uma correlação com o STn. Ao contrário do que foi encontrado em estudos referentes ao carcinoma gástrico Borrmann tipo IV, que revelaram que a expressão do STn é baixa nos tumores primários, mas que se correlaciona bem com a extensão do tumor, metástases dos nódulos linfáticos e disseminação peritoneal (Kakeji *et alii*, 1995). A variabilidade dos resultados pode resultar do tipo de tumor, do tamanho da amostra, bem como de outros fatores desconhecidos tais como os tratamentos tumorais prévios realizados.

A relação entre STn/gânglios metastizados mostrou-se estatisticamente significativa. Neste estudo, a maioria dos doentes com metastização ganglionar tinha tumores com expressão STn positiva. Estes resultados são sobreponíveis aos encontrados por outros autores, Ferreira *et alii*, 2013 e são, de alguma forma, indicadores da agressividade que este marcador confere.

Pouco está descrito sobre a expressão do antígeno carbohidratado associado ao tumor sialil Tn, no cancro da bexiga. No entanto, Ferreira *et alii*, 2013 relataram que a maioria dos tumores de bexiga de alto grau, e com elevadas taxas de proliferação e alto risco de recidiva/progressão expressa STn. No nosso estudo, a correlação entre o antígeno STn e o índice de proliferação Ki67, também, se mostrou estatisticamente significativa.

O antígeno T (ou TF), em alguns estudos está relacionado a um mau prognóstico (Barrow *et alii*, 2013). A sua forma sialilada (sialil T – S6T) é ainda pouco estudada. No presente trabalho foi pesquisada a imunoexpressão deste antígeno apenas nos casos STn negativos, com o intuito de verificar se os casos STn negativos de pior prognóstico o seriam devido à presença de ST. Tal não se verificou, não sendo o S6T, neste estudo, uma variável discriminatória em relação às variáveis clinico-patológicas.

Um estudo realizado por Margulis *et alii*, 2006 numa amostra de 226 casos de tumores vesicais removidos por cistectomia radical com linfadenectomia bilateral, revelou que a expressão da proteína Ki67 estava significativamente associada com o alto grau de diferenciação, estágio avançado, invasão de nódulos linfáticos regionais e metástases distantes. Segundo os nossos resultados, observou-se que a maioria dos carcinomas com expressão Ki67 positiva, apesar de não terem expressão estatística, são de alto grau (33/36) e músculo-invasivos (20/36). Além disso, a maioria dos tumores de baixo grau (13/16) e não-músculo-invasivos (31/47) não mostra positividade na expressão da proteína Ki67. Para além disso, 58% das neoplasias com gânglios não metastizados apresenta negatividade na proteína Ki67.

Em relação à morte por cancro, a maioria dos doentes com imunexpressão negativa Ki67, ainda estão vivos ou morreram por outras causas que não cancro. Segundo, Ma *et alii*, 2010 a análise imunohistoquímica da proteína Ki67 no cancro colorretal, sugere que os pacientes com elevada expressão Ki67 têm menor sobrevida.

No presente estudo, verifica-se que a maioria das recidivas é não proliferativa e que a maioria dos tumores proliferativos é primária. O mesmo foi observado por Chen *et alii*, 2002 sendo que, os tumores recorrentes do CUB superficial de baixo grau não têm um maior índice de proliferação Ki67 que os tumores primários. Todavia, os resultados encontrados por outros autores são diversos. Segundo Margulis *et alii*, 2009 o elevado índice de marcação Ki67 está associado à recorrência do CUB avançado e portanto, a proteína Ki67 tem o potencial de melhorar a identificação de pacientes que estão em maior risco de progressão da doença após cistectomia radical.

Ainda na observação dos resultados, o alto grau de diferenciação, o estágio tumoral avançado e a expressão positiva do antigénio STn revelaram-se, na análise univariada, como fatores de prognóstico que se associaram a uma sobrevida global menor. Estes resultados são sobreponíveis aos encontrados por outros autores (Sylvain *et alii*, 2012; Ferreira *et alii*, 2013).

Neste momento, os resultados são ainda preliminares e carecem de mais estudos que os comprovem, nomeadamente através do aumento do tamanho da coorte das amostras.

2.6 - Conclusões

Neste estudo, verificou-se que o antígeno glicosídico STn está presente nos tumores de mau prognóstico e associado a menor sobrevida global dos pacientes com CUB. A sua imunorreatividade foi associada à proliferação celular descontrolada, alto grau de diferenciação celular, estágio tumoral avançado, metastização ganglionar e morte por cancro.

Os mecanismos que conduziram à expressão do antígeno STn não foram alvo deste trabalho, no entanto percebe-se que têm um papel muito importante no desenvolvimento/progressão do tumor.

Em relação ao índice de proliferação Ki67, verificou-se que a maioria dos tumores proliferativos é primária. Apesar dos vários estudos que fazem referência ao Ki67 como um bom marcador de prognóstico, neste trabalho, a sua relação com as diferentes variáveis estudadas não teve a significância esperada. Mesmo assim, os resultados mostraram que este marcador se correlaciona com o estágio de invasão e grau de diferenciação.

Futuramente pretende-se estudar os mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento do CUB e o efeito de vacinas com base em TACAs no tratamento desta neoplasia, uma vez que o seu prognóstico é sombrio e os resultados com base nas terapêuticas correntes não se têm revelado completamente eficazes.

III - Conclusão geral

O antígeno sialil-Tn é considerado um marcador de diagnóstico e subsequentemente de prognóstico de alguns tipos de cancro. Verificou-se, com este trabalho, que a sua expressão também se associa ao carcinoma da bexiga avançado. A descoberta de que a generalidade das células epiteliais adultas normais não exibem este epítipo, transformo-o num antígeno interessante para estudos de imunização. Vacinas totalmente sintéticas dirigidas contra o antígeno sialil-Tn são uma opção atraente para o tratamento do cancro.

A exploração do sistema imunitário do paciente (imunoterapia) surge como uma abordagem interessante, oferecendo o potencial de melhorar os efeitos de um tratamento convencional, sem aumentar substancialmente a toxicidade. Enquanto impulsionar respostas imunes contra o tumor será suficiente para o erradicar. Desta forma, poderá ser crucial na eliminação de doença mínima residual, micrometástases após tratamento primário ou na prevenção da transformação maligna a partir de uma lesão precursora.

Assim, o estudo de potenciais alvos para a imunização constitui uma abordagem promissora, promovendo o desenvolvimento de memória imunológica, o que oferece proteção durante anos ou mesmo décadas.

IV - Referências Bibliográficas

American Cancer Society. (2013). *Cancer Facts and Figures 2013*. Atlanta, American Cancer Society.

Babjuk, M. *et alii*. (2013). *Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta T1 and CIS)*. In: EAU Guidelines, edn. presented at the EAU Annual Congress Congress Milan, 2013.

Barrow, H. *et alii*. (2013). Suppression of Core 1 Gal-Transferase Is Associated with Reduction of TF and Reciprocal Increase of Tn, sialyl-Tn and Core 3 Glycans in Human Colon Cancer Cells. *PLoS One*, 8(3), e59792.

Brockhausen, I. (1999). Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1473(1), pp. 67-95.

Brockhausen, I., Schachter, H., Stanley, P. (2009). O-GalNAc Glycans. In: Varki, A. *et alii*. (Ed.). *Essentials of Glycobiology, 2nd edition*. California, Cold Spring Harbor (NY), Chapter 9.

Burger, M. *et alii*. (2007). Mcm2 predicts recurrence hazard in stage Ta/T1 bladder cancer more accurately than CK20, Ki67 and histological grade. *Br J Cancer*, 96(11), pp. 1711-1715.

Cazet, A. *et alii*. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydr Res*, 345, pp. 1377–1383.

Chen, SC. *et alii*. (2002). Prognostic Significance of the Ki-67 Index in Predicting Tumor Recurrence for Low-grade Superficial Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *JTUA*, 13(3), pp. 114-118.

Clément, M. *et alii*. (2004). Expression of sialyl-Tn epitopes on beta1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *J Cell Sci*, 117(21), pp. 5059-5069.

Cohen, S., Shirai, T., Steineck, G. (2000). Epidemiology and etiology of premalignant and malignant urothelial changes. *Scand J Urol Nephrol*, 205, pp. 105-115.

Colombel, M. *et alii.* (2008). Epidemiology, Staging, Grading, and Risk Stratification of Bladder Cancer. *Eur Urol*, 7, pp. 618-626.

Crallan, R., Georgopoulos, N., Southgate, J. (2006). Experimental models of human bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(3), pp. 374-381.

Dall'Olio, F., Chiricolo, M. (2001). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J*, 18(11-12), pp. 841-580.

Danussi, C. *et alii.* (2009). A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction. *Glycobiology*, 19(10), pp. 1056-1067.

Davidson, B. *et alii.* (2010). Expression of carbohydrate antigens in advanced-stage ovarian carcinomas and their metastases – A clinicopathologic study. *Gynecol Oncol*, 77(1), pp. 35-43.

Desai, P. (2000). Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Transfus Med Rev*, 14(4), pp. 312–325.

Disis, M. (2006). *MUC1 Vaccines as Emerging Therapeutic Options for Cancer Patients*. Seattle, WA, Merck.

Drug Information Online. [Em linha]. Disponível em <<http://www.drugs.com/health-guide/bladder-cancer.html>>. [Consultado em 20/11/2012].

Eble, J. *et alii.* (2004). Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. In: Kleihues, P., Sobin, L. (Ed.). *World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 90-157.

Enache, M., Simionescu, C., Lascu, L. (2012). Ki67 and Bcl-2 immunoexpression in primitive urothelial bladder carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*, 53(3), pp. 521-525.

Epstein, J. *et alii.* (1998). The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol*, 22(12), pp. 1435-1448.

Ferreira, JA. *et alii.* (2013). Overexpression of tumour-associated carbohydrate antigen sialyl-Tn in advanced bladder tumours. *Mol Oncol*, 7(3), pp. 719-731.

Fritsche, H. *et alii.* (2010). Characteristics and outcomes of patients with clinical T1 grade 3 urothelial carcinoma treated with radical cystectomy: results from an international cohort. *Eur Urol*, 57(2), pp.300-309.

Galonić, D., Gin, D. (2007). Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines. *Nature*, 446(7139), pp. 1000–1007.

Gilewski, T., Ragupathi, G., Dickler, M. (2007). Immunization of High-Risk Breast Cancer Patients with Clustered STn-KLH Conjugate plus the Immunologic Adjuvant QS-21. *Cancer Res*, 13, pp. 2977-2985.

Hagen, K., Fritz, T., Tabak, L. (2003). All in the family: the UDPGalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*, 13, 1R–16R.

Hassan, H. *et alii* (2000). O-Glycan Occupancy is Directed by Substrate Specificities of Polypeptide GalNAc-Transferases. *In: Ernst, B., Hart, G., Sinay, P. (Ed.). Carbohydrates in Chemistry and Biology.* Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 273–292.

Herr, H. *et alii.* (2004). Surgical factors influence bladder cancer outcomes: a cooperative group report. *J Clin Oncol*, 22, pp.2781-2789.

Itzkowitz, S. *et alii.* (1989). Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res*, 49(1), pp. 197–204.

Iwai, T. *et alii.* (2002). Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta1,3-Nacetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans. *J Biol Chem*, 277(15), pp. 12802–12809.

Jacobs, B., Lee, C., Montie, J. (2010). Bladder Cancer in 2010: How Far Have We Come? *CA Cancer J Clin*, 60(4), pp. 244-272.

Jeon, I. *et alii.* (2009). A New Model for the Presentation of Tumor-Associated Antigens and the Quest for an Anticancer Vaccine: A Solution to the Synthesis Challenge via RCM. *J Am Chem Soc*, 131(40), pp. 14337–14344.

Ju, T. *et alii.* (2008). Human Tumor Antigens Tn and Sialyl Tn Arise from Mutations in Cosmc. *Cancer Res*, 68(6), pp. 1636-1646.

Julien, S., Videira, P., Delannoy, P. (2012). Sialyl-Tn in cancer: How did we miss the target? *Biomolecules*, 2, pp. 435-466.

Júnior, P. *et alii.* (2007). A inter-relação das sialomucinas (antígenos Tn e STn) com o adenocarcinoma no esôfago de Barrett. *Rev Assoc Med Bras*, 53(4), pp. 360-364.

Takeji, Y. *et alii.* (1995). Correlation between sialyl Tn antigen and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma. *Br J Cancer*, 71, pp. 191-195.

Kamat, A., Mathew, P. (2011). Bladder cancer: imperatives for personalized medicine. *Oncology*, 25(10), pp. 951-958.

Kausch, V. (2010). Diagnosis of and therapy for non-muscle-invasive bladder cancer - state of the art. *Aktuelle Urol*, 41(5), pp. 307-315.

Kirkali, Z. *et alii.* (2005). Bladder Cancer: epidemiology, staging, and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6), pp. 4-34.

Kurosawa, N. *et alii.* (2000). Molecular cloning and genomic analysis of mouse GalNAc alpha2, 6-sialyltransferase (ST6GalNAc I). *J Biochem*, 127(5), pp. 845–854.

Langkilde, N.C. (1995). T-antigens in primary non-invasive and superficially invasive human urinary bladder tumors: the correlation to tumor recurrence and tumor progression. A mini-review. *Scand J Urol Nephrol Suppl*, 172, pp. 45-49.

Limas, C. (1991). Quantitative interrelations of Lewis antigens in normal mucosa and transitional cell bladder carcinomas. *J Clin Pathol*, 44(12), pp. 983-989.

Ma, YL. *et alii.* (2010). Immunohistochemical analysis revealed CD34 and Ki67 protein expression as significant prognostic factors in colorectal cancer. *Med Oncol*, 27(2), pp. 304-309.

Maarouf, A. *et alii.* (2011). Bladder preservation multimodality therapy as an alternative to radical cystectomy for treatment of muscle invasive bladder cancer. *BJU Int*, 107(10), pp. 1605-1610.

Madame Curie Bioscience Database. [Em linha]. Disponível em <<http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/5257/>>. [Consultado em 27/12/2012].

Madersbacher, S., Studer, U. (2002). Contemporary cystectomy and urinary diversion. *World J Urol*, 20(3), pp.151-157.

Madsen, C. *et alii.* (2012). Cancer Associated Aberrant Protein O-Glycosylation Can Modify Antigen Processing and Immune Response. *PLoS One*, 7(11), pp. 1-10.

Malmstrom, P. *et alii.* (2009). An individual patient data meta-analysis of the longterm outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 56(2), pp. 247-256.

Marcos, N. *et alii.* (2004). Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Res*, 64, pp. 7050-7057.

Margulis, V. *et alii.* (2006). Ki67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease. *Clin Cancer Res*, 12(24), pp. 7368-7373.

Margulis, V. *et alii.* (2009). Multi-Institutional Validation of the Predictive Value of Ki-67 Labeling Index in Patients With Urinary Bladder Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(2), pp.114-119.

Meluch, A. *et alii.* (2001). Paclitaxel and gemcitabine chemotherapy for advanced transitional-cell carcinoma of the urothelial tract: a phase II trial of the Minnie pearl cancer research network. *J Clin Oncol*, 19, pp. 3018-3024.

Metts, M. *et alii.* (2000). Bladder Cancer: A Review of Diagnosis and Management. *J Natl Med Assoc*, 92 (6), pp. 285-294.

Miladi, M. *et alii.* (2003). The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumours. *Eur Urol*, 43(3), pp. 241-245.

Milowsky, M., Stadler, W., Bajorin, D. (2008). Integration of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy and cystectomy in the treatment of muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*, 102(9), pp. 1339-1344.

Molinaro, J. *et alii.* (2011). Cancer Vaccines and Carbohydrate Epitopes. *Vaccine*, 29(48), pp. 8802-8826.

Morelli, L., Poletti, L., Lay, L. (2011). Carbohydrates and Immunology: Synthetic Oligosaccharide Antigens for Vaccine Formulation. *European J Org Chem*, pp. 5723–5777.

Morgan, T., Clark, P. (2010). Bladder cancer. *Curr Opin Oncol*, 22(3), pp. 242-249.

National Cancer Institute. [Em linha]. Disponível em <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/results_merged/topic_med_age.pdf>. [Consultado em 02/11/2013].

National Cancer Institute. [Em linha]. Disponível em <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/results_merged/topic_age_dist.pdf>. [Consultado em 02/11/2013].

National Cancer Institute. [Em linha]. Disponível em <<http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/bladder/page4>>. [Consultado em 15/10/2012].

Ogata, S. *et alii.* (2001). A rat model to study the role of STn antigen in colon cancer. *Glycoconj J*, 18, pp. 871-882.

Ohyama, C. (2008). Glycosylation in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*, 13(4), pp. 308-313.

Ok, J., Meyers, F., Evans, C. (2005). Medical and surgical palliative care of patients with urological malignancies. *J Urol*, 174(4), pp. 1177-1182.

Pashos, C. *et alii*. (2002). Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*, 10(6), pp.311-322.

Pedersen, J. *et alii*. (2011). Lectin Domains of Polypeptide GalNAc Transferases Exhibit Glycopeptide Binding Specificity. *J Biol Chem*, 286(37), pp. 32684–32696.

Peracaula, R. *et alii*. (2008). Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers*, 25, pp. 207-218.

Reis, C. *et alii*. (2010). Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol*, 63(4), pp. 322-329.

Reis, C. *et alii*. (2011). Glycopeptide Microarray for Autoantibody Detection in Cancer. *Expert Rev Proteomics*, 8(4), pp. 435-437.

Rillahan, C., Paulson, J. (2011). Glycan microarrays for decoding the glycome. *Annu Rev Biochem*, 80, pp. 797-823.

Rodel, C. *et alii*. (2002). Combined-modality treatment and selective organ preservation in invasive bladder cancer: long-term results. *J Clin Oncol*, 20(14), pp. 3061-3071.

RON. (2006). Registo Oncológico Nacional. [Em linha]. Disponível em <http://issuu.com/ipoportodo/docs/ron_2006_print_reduce?e=7796583/2503360>. Consultado em 15/10/2012].

Rozanski, T., Grossman, H. (1994). Recent Developments in the Pathophysiology of Bladder Cancer. *AJR Am J Roentgenol*, 163(4), pp.789-792.

Santos, L. *et alii*. (2003). Ki-67 index enhances the prognostic accuracy of the urothelial superficial bladder carcinoma risk group classification. *Int J Cancer Suppl*, 105(2), pp. 267-272.

Sauter, G. *et alii*. (2004). Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble, J. *et alii*. (Ed.). *World Health Organization Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 29-34.

SBH Sciences. [Em linha]. Disponível em <http://www.sbhsociences.com/Carbohydrate_Cancer_Antigens.asp>. [Consultado em 27/12/2012].

Schumacher, M. *et alii*. (2010). Transurethral resection of non-muscle invasive bladder transitional cell cancers with or without 5-aminolevulinic acid under visible and fluorescent light: results of a prospective, randomised, multicentre study. *Eur Urol*, 57(2), pp.293-299.

Semczuk, A. *et alii*. (2002). Sialosyl-Tn expression in normal and pathological conditions of human endometrium. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract*, 198(9), pp. 589-95.

Shariat, S. *et alii*. (2006). Characteristics and outcomes of patients with carcinoma in situ only at radical cystectomy. *Urology*, 68(3), pp.538-542.

Sharma, S., Ksheersagar, P., Sharma, P. (2009). Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer. *Am Fam Physician*, 80(7), pp. 717-723.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2013). Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63(1), pp. 11-30.

Slovin, S., Keding, Stacy., Ragupathi, G. (2005). Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol Cell Biol*, 83, pp. 418–428.

Soares, R. Marinho, A. Schmitt, F. (1996). Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol Res Pract*, 192(12), pp. 1181-1186.

Springer, G. (1984). T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 224 (4654), pp. 1198–1206.

Springer, G. (1989). Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness. *Mol Immunol*, 26(1), pp. 1–5.

Stavropoulos, N. *et alii*. (1993). Growth fractions in bladder cancer defined by Ki67: association with cancer grade, category and recurrence rate of superficial lesions. *Br J Urol*, 72(5), pp. 736-739.

Stepan, A. *et alii.* (2011). P16, c-erbB2 and Ki67 immunoexpression in urothelial carcinomas of the bladder. *Rom J Morphol Embryol*, 52(2), pp. 653-658.

Stenzl, A. (1999). Bladder substitution. *Curr Opin Urol*, (3), pp. 241-245.

Sylvain, J. *et alii.* (2012). Sialyl-Tn in Cancer: (How) Did We Miss the Target?. *Biomolecules*, 2(4), pp. 435-466.

Sylvester, R. *et alii.* (2005). Bacillus Calmette-Guerin versus chemotherapy in the intravesical treatment of patients with carcinoma in situ of the bladder: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol*, 174(1), pp. 86-92.

Sylvester, R. *et alii.* (2006). Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol*, 49(3), pp.466-477.

Tanaka, M., Sonpavde, G. (2011). Diagnosis and management of urothelial carcinoma of the bladder. *Postgrad Med*, 123(3), pp. 43-55.

Tarp, M., Clausen, H. (2007). Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim Biophys, Acta* 1780 (2008), pp. 546–563.

Tongzhong, J. *et alii.* (2002). Cloning and Expression of Human Core 1 β 1,3-Galactosyltransferase*. *J Biol Chem*, 277(1), pp. 178–186.

Videira, P. *et alii.* (2009). ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer*, 9(1), pp. 357.

Xu, Y. *et alii.* (2005). Tumor-associated carbohydrate antigens: a possible avenue for cancer prevention. *Immunol Cell Biol*, 83(4), pp. 440–448.

Witjes, J. *et alii.* (2013). *Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer*. In: EAU Guidelines, edn. presented at the EAU Annual Congress Congress Milan, 2013.

Wopereis, S. *et alii.* (2006). Mechanisms in Protein O-Glycan Biosynthesis and Clinical and Molecular Aspects of Protein O-Glycan Biosynthesis Defects: A Review. *Clin Chem*, 52(4), pp. 574-600.

Yamada, T. *et alii*. (1988). Changing expression of ABH blood group and cryptic T-antigens of noninvasive and superficially invasive papillary transitional cell carcinoma of the bladder from initial occurrence to malignant progression. *Cancer*, 61(4), pp. 721-726.

Yamada, T. *et alii*. (1995). Sialosyl Tn antigen expression in associated with the prognosis of patients with advanced gastric cancer. *Cancer*, 76(9), pp. 1529-1536.

Yoon, J. *et alii*. (2012). Organ specificity of the bladder carcinogen 4-aminobiphenyl in inducing DNA damage and mutation in mice. *Cancer Prev Res*, 5(2), pp. 299-308.

Zaak, D. *et alii*. (2005). Diagnosis of urothelial carcinoma of the bladder using fluorescence endoscopy. *BJU Int*, 96(2), pp. 217-222.

V - Anexos

Protocolo de Imunohistoquímica

1. Desparafinação dos cortes histológicos em xilol (5'+5');
2. Hidratação numa série decrescente de álcoois e água destilada (3' cada);
3. Bloqueio das peroxidases endógenas com Peróxido de Hidrogénio a 3% (10');
4. Lavagem em Tween-PBS 1x (2x3');
5. Recuperação antigénica pelo calor (micro-ondas) com tampão citrato a pH 6 (1' potência máxima, 15' potência média);
6. Deixar arrefecer 20';
7. Lavagem em Tween-PBS 1x (2x 3');
8. Incubação com soro normal UVBlock 10' (UltraVision Large Vol Anti-Polyvalent, Thermo Scientific LabVision);
9. Incubação com soro primário monoclonal STn (1:20; TKH2 hibridoma), Ki67 (1:100; Mib 1, Dako), *overnight*, a 4°C;
10. Lavagem em Tween-PBS 1x (2x 3');
11. Incubação com soro secundário biotinilado 10' (Thermo Scientific LabVision);
12. Lavagem em Tween-PBS 1x (2x 3');
13. Incubação com o complexo Streptavidina 10' (Thermo Scientific LabVision);
14. Lavagem em Tween-PBS 1x (2x 3');
15. Revelação com 3,3-diaminobenzidina 5' (DAB, Thermo Scientific LabVision);
16. Lavagem em água destilada (5');
17. Contraste nuclear com Hematoxilina de Harris 1' 30'' (Sigma);
18. Lavagem em água corrente (10');
19. Desidratação numa série crescente de álcoois (3' cada);
20. Montagem em *Entellan* (Merck).

Protocolo de Imunohistoquímica – S6T

Para a deteção do antigénio S6T, antes da incubação com o anticorpo primário, faz-se um tratamento enzimático com β -(1-3)-Galactosidase da *Xanthomonas campestris* (R&Dsystems) durante 2 horas.