



Gisela Patrícia de Sousa Machado Nogueira Alves

**Antígenos Tumorais no Tratamento e Diagnóstico de Carcinomas**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2012





Gisela Patrícia de Sousa Machado Nogueira Alves

**Antígenos Tumorais no Tratamento e Diagnóstico de Carcinomas**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2012

Gisela Patrícia de Sousa Machado Nogueira Alves

**Antígenos Tumorais no Tratamento e Diagnóstico de Carcinomas**

**Trabalho original realizado por:**

---

**Orientadora:** Doutora Sofia Pereira

Projeto de Pós-graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Sumário**

O cancro é uma patologia que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Em particular, o cancro da bexiga é a neoplasia que mais frequentemente se verifica ao nível do trato urinário. Este carcinoma pode ser distinguido histologicamente em três tipos – carcinoma de células transicionais (cerca de 90% dos casos), espinocelular ou adenocarcinoma, sendo vários os fatores associados.

Tendo em conta que o cancro está relacionado com alterações ao nível da glicosilação, este trabalho tem em vista a pesquisa de possíveis alternativas de tratamentos, nomeadamente a imunoterapia baseada em fenómenos de glicosilação aberrante, como por exemplo a produção de antigénios tumorais à superfície celular de carcinomas, uma vez que nem sempre os tratamentos convencionais como a quimioterapia, radioterapia, cistectomia ou imunoterapia baseada em BCG, se mostram completamente eficazes.

Desta forma, avaliou-se resultados obtidos em diversos estudos, na tentativa de analisar uma possível terapêutica eficaz ou de, pelo menos, realçar certos fenómenos importantes para uma futura investigação.

Em alguns estudos, os antigénios carbohidratados associados a tumor (TACAs) mostraram resultados positivos, podendo vir a ser um alvo de bastante interesse na imunoterapia relacionada com o carcinoma da bexiga.

**Palavras-chave:** Ácidos siálicos, Cancro, Carcinoma da Bexiga, Glicosilação aberrante, Hidratos de carbono, Lectinas, Lewis, Mucinas, TACAs, Thomsen-Friedenreich, Imunoterapia.

## **Abstract**

Cancer is a disease that affects millions of people worldwide. In particular, the bladder cancer is the most frequently cancer that occurs at the urinary tract. This carcinoma can be histologically distinguished in transitional cell carcinoma (90% of cases), squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, having several factors associated.

Taking into account that cancer is related to changes in glycosylation, this work is aimed at the search of possible alternative treatments, including immunotherapy, based on aberrant glycosylation phenomena, such as the production of tumor antigens on the cell surface of carcinoma, because not always conventional treatments like chemotherapy, radiotherapy, cystectomy or BCG immunotherapy, show complete efficacy.

Thus, it was evaluated results of various studies, in an attempt to examine a potential effective therapeutic or, at least, enhance certain important phenomena for further investigations.

In some studies, tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs) showed positive results, making TACAs a target of great interest in immunotherapy in bladder cancer.

**Keywords:** Sialic acids, Cancer, Bladder Cancer, Aberrant Glycosylation, Carbohydrates, Lectins, Lewis, Mucins, TACAs, Thomsen-Friedenreich, Immunotherapy.

## **Agradecimentos**

Não podia deixar de agradecer a várias pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram a realização deste projeto de pós-graduação possível.

Assim, o meu agradecimento à Doutora Sofia Pereira, pela sua disponibilidade na orientação deste trabalho, pela paciência, conselhos, sugestões e esclarecimentos.

Aos meus colegas e amigos, pela amizade e ajuda demonstrada ao longo destes anos, em especial à Tânia.

Aos meus pais, por todo o apoio, pela oportunidade que me deram de tirar o curso, e pelos sacrifícios suportados;

Aos meus irmãos e respetiva família, pelo incentivo e preocupação.

Ao Hugo, por ser o meu pilar dando-me imensa força e carinho e por me acompanhar sempre.

## Índice

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO II: O CANCRO .....	16
2.1) Definição .....	16
2.2) Epidemiologia.....	16
CAPÍTULO III: CANCRO DA BEXIGA.....	19
3.1) Epidemiologia.....	19
3.2) Classificação do Cancro da Bexiga .....	20
3.3) Fatores de Risco .....	21
3.3.1) Outros Fatores de Risco .....	23
3.4) Sintomas .....	24
3.5) Diagnóstico.....	24
3.6) Tratamento.....	29
3.6.1) Cistectomia Radical .....	29
3.6.2) Quimioterapia .....	29
3.6.3) Radioterapia .....	32
3.6.4) Imunoterapia por BCG.....	33
3.7) Prevenção .....	36
CAPÍTULO IV: GLICOSILAÇÃO.....	37
4.1) Hidratos de Carbono.....	37
4.2) Mucinas.....	40
4.3) Lectinas.....	40
4.4) Ácidos Siálicos .....	45
4.5) Glicosilação Aberrante .....	47
4.6) Antígenos Carbohidratados Associados a Tumor (TACAs) .....	48
I. Antígenos de Lewis .....	49

II. Antígenos Thomsen-Friedenreich relacionados .....	51
CAPÍTULO V: IMUNOTERAPIA .....	55
5.1) Sistema imunitário e desenvolvimento de vacinas .....	55
5.2) Imunoterapia baseada em TACAs .....	56
5.3) Imunoterapia MUC1 .....	59
CAPÍTULO VI: CONCLUSÃO.....	60
BIBLIOGRAFIA .....	61

## Índice de Figuras

Ilustração 1: Taxa de incidência (por 100 000) do cancro da bexiga nos homens (a) e nas mulheres (b) (Colombel <i>et al.</i> , 2008). .....	19
Ilustração 2: Classificação TNM do cancro da bexiga (Bostrom <i>et al.</i> , 2010).....	27
Ilustração 3: a) Esquema do sistema de classificação TNM; b) Uretélio normal; c) Células desorganizadas (displasia), elevado grau; d) Tumor papilar superficial de baixo grau; e) Tumor de elevado grau com invasão do tecido muscular (m) (Knowles, 2005). .....	28
Ilustração 4: Fármacos que podem ser usados na quimioterapia e taxa de resposta correspondente (ORR) (Ismaili <i>et al.</i> , 2011). .....	31
Ilustração 5: Efeitos secundários provocados pelo uso de gemcitabina em pacientes de grau 3 e grau 4 (Stadler <i>et al.</i> , 1997). .....	31
Ilustração 6: Quimioterapia de 1ª linha no cancro da bexiga metastático (Fletcher <i>et al.</i> , 2001).....	32
Ilustração 7: Cascata da resposta imune na mucosa da bexiga após instilação por BCG (Askeland <i>et al.</i> , 2012). .....	35
Ilustração 8: Tipos de N-glicanos (Varki <i>et al.</i> , 2009) .....	38
Ilustração 9: Glicoproteínas de várias amostras biológicas que podem ser usadas como biomarcadores no cancro (Kim e Misek, 2011) .....	39
Ilustração 10: Interação entre lectinas e hidratos de carbono. As Lectinas atuam como um meio de adesão de diferentes células como os vírus, através dos hidratos de carbono (Sharon e Lis, 2004). .....	41
Ilustração 11: Contributo da galectina-1 na progressão de tumores (Rabinovich, 2005).....	44
Ilustração 12: Ácidos siálicos na superfície celular e moléculas segregadas (Varki, 2007).....	45
Ilustração 13: Possíveis substituições nos resíduos R (Varki <i>et al.</i> , 2009) .....	46
Ilustração 14: Ácidos siálicos mais comuns: Neu5GC e Neu5Ac (Varki, 2007).....	46
Ilustração 15: Estrutura dos Antígenos Carbohidratados Associados a Tumor (TACAs) (Schietinger <i>et al.</i> , 2008). .....	49
Ilustração 16: Esquema representativo da síntese dos antígenos Thomsen-Friedenreich relacionados (Dall'Olio e Chiricolo, 2001).....	51

## **Lista de Abreviaturas**

**APCs:** Células Apresentadoras de Antígenos

**Asn:** Asparagina

**BCG:** Bacilo Calmette - Guérin

**BCR:** Recetores de Células B

**Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>:** Fosfato de Cálcio

**CMP-Neu5Ac:** Citidina 5-Monofosfato Prime-Sintetase ácido N-acetilneuramínico

**CRD:** Carbohydrate Recognition domain

**CTL:** Lectina Tipo C

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**EUA:** Estados Unidos da América

**FISH:** Hibridização *in situ* de Fluorescência

**Fuc:** Fucosidase-  $\alpha$ -L-1

**Gal:** Galactose

**Gal ( $\beta$  1 -3) GlcNAc:** determinante carbohidratado de Lewis, tipo I

**GalNAc:** N-acetilgalactosamina

**GlcNAc:** N-acetilglucosamina

**Glc2Man9GlcNA2:** Glucose-Manose-N-acetilglucosamina

**GSTM1:** Glutathione S-transferase M1

**GSTT1:** Glutathione S-transferase teta1

**HCA:** Aminas Heterocíclicas

**IBCG:** Grupo Internacional do Cancro da Bexiga

**IgG:** Imunoglobulina G

**IgM:** Imunoglobulina M

**Le<sup>a</sup>:** Antígeno de Lewis a

**Le<sup>b</sup>:** Antígeno de Lewis b

**Le<sup>x</sup>:** Antígeno de Lewis x

**Le<sup>y</sup>:** Antígeno de Lewis y

**MCV:** Vacina de Células de Melanoma

**MPL:** Lípido Monofosforil

**MTHFR:** Metilenotetrahidrofolato redutase

**mRNA:** RNA mensageiro

**MUC:** Mucina

**MVAC:** Metotrexato, Vinblastina, Doxorubicina; Cisplatina

**NAT2:** N-acetyltransferase 2

**NQO1:** NADH quinona oxidoreductase 1

**Neu5Gc:** N-glicolilneuramínico

**Neu5Ac:** N-acetilneuramínico

**OGT:** O-GlcNAc transferase

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**ORR:** Taxa de Resposta Correspondente

**PAMPs:** Padrões Moleculares Associados a Patogénicos

**Pro:** Prolina

**PRRs:** Recetores Padrão de Reconhecimento

**RNA:** Ácido Ribonucleico

**RORENO:** Registo Oncológico da Região Norte

**RTU-V:** Cirurgia Urológica Transuretral e Vesical

**SAM:** S-adenosilmetionina

**Ser:** Serina

**Sias:** Ácidos Siálicos

**sLe<sup>a</sup>:** Antígeno de Lewis a sialilado

**sLe<sup>x</sup>:** Antígeno de Lewis x sialilado

**sTn:** Antígeno Tn sialilado

**ST6Gal:**  $\alpha$  2, 6-Sialiltransferase

**ST3Gal:**  $\alpha$  2, 3-Sialiltransferase

**ST6GalNAc:** N- ( $\alpha$ -N-acetil-neuraminil-2,3-  $\beta$  -galactosil-1,3) -acetilgalactosamina  $\alpha$ -2,6-sialiltransferase

**ST8Sia:**  $\alpha$  2, 8-Sialiltransferase

**SWOG:** Western Oncology Group

**TACAs:** Antígenos Carbohidratados Associados a Tumor

**TC:** Tomografia Computorizada

**TCC:** Carcinoma de Células Transicionais

**TCR:** Recetores de Células T

**TF:** Antígeno Thomsen-Friedenreich

**T<sub>H</sub>:** Células T-Helper

**Thr:** Treonina

**TNM:** Tumor, Gânglio (node), Metástases

**UDP:** Uridina difosfato

**Xaa:** Qualquer aminoácido

## CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

O cancro é uma patologia que tem sido alvo de elevado interesse dado o número de pessoas que são afetadas em todo o mundo. Assim, inúmeros estudos são realizados de forma a melhorar a sua deteção e, finalmente, encontrar a sua cura.

O cancro caracteriza-se por ser uma doença a nível do genoma das células, devido a mutações que ocorrem no código genético. Desta forma, as células começam a crescer de forma desregulada, resistindo à morte celular. Adicionalmente, têm a capacidade de migrar para outras áreas do corpo e formar novos tumores (metástases).

Os hidratos de carbono são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza e quase todos os organismos os sintetizam e metabolizam. Situam-se ao nível da membrana celular e a sua variabilidade está relacionada com certas características como a capacidade de formar diferentes tipos de ligações glicosídicas, características moleculares, o tipo de ligação estabelecida, a posição e a ausência ou presença de ramificações (Ghazarian *et al.*, 2011). Estes desempenham funções importantes na célula como a sua estabilização mecânica, ligação célula-célula ou célula-matriz extracelular, divisão celular (Kartal *et al.*, 2011), sinalização celular, resposta imune do hospedeiro, metastização e rigidez da membrana (Ghazarian *et al.*, 2011).

Estas funções normais estão visivelmente modificadas na presença de cancro, graças a um processo de glicosilação aberrante, onde ocorrem alterações ao nível da biossíntese do glicano (hidrato de carbono), como a expressão de glicosiltransferases e glicosidases. A expressão aberrante destas enzimas faz com que as células cancerosas produzam glicolípidos e glicoproteínas com glicanos modificados. Estas diferenças entre as células normais e cancerosas, permitem usar os hidratos de carbono como biomarcadores para o diagnóstico e tratamento de cancro (Meany e Chan, 2011).

Com a glicosilação aberrante forma-se os TACAs que são antigénios carbohidratados associados a tumor. Um estudo realizado por Therkildsen *et al.* (1995) verificou a acumulação de antigénios T e antigénios T sialilados no citoplasma, membrana e mucina, de diferentes tipos de tumores, com exceção de carcinomas em células acinares.

Estes antigénios são os antigénios Thomsen-Friedenreich, pertencentes a um grupo biossinteticamente ligado a hidratos de carbono (Cao *et al.*, 1996). Também os

antigénios de Lewis têm mostrado estar relacionados com alguns tipos de cancro sendo igualmente usados como biomarcadores (Ramsland *et al.*, 2004).

O presente trabalho foi direcionado para o cancro da bexiga.

Existem três tipos de cancro de bexiga: carcinoma de células de transição, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma (National Cancer Institute, 2011).

A este estão associadas várias causas como o fumo do cigarro (Moore *et al.*, 2004), a exposição química no trabalho, quimioterapia, radioterapia, infeções na bexiga, assim como a própria dieta (García-Closas *et al.*, 2007). Segundo Badawi (1996), este género de carcinoma é o mais comum em países tropicais e subtropicais, sendo, neste caso, associado à infeção por schistosomíases endémicas (por *Schistosoma haematobium*).

O tratamento deste tumor, depende da fase em que o mesmo se encontra, podendo envolver desde a cirurgia, a quimioterapia, ou a imunoterapia. Nesta última englobam-se as vacinas, estudadas há já alguns anos, mas cujo interesse tem vindo a aumentar atualmente, no sentido de se conseguir desenvolver uma vacina eficaz para o tratamento do cancro.

## **CAPÍTULO II: O CANCRO**

### **2.1) Definição**

O cancro é uma patologia genética que resulta do acumular progressivo de mutações ao nível do genoma das células. Ao longo do tempo, estas células podem alcançar capacidade de invasão e metastização.

A malignidade do tumor depende de vários fatores como por exemplo, a motilidade e capacidade de invasão das células tumorais através da matriz pericelular e da membrana basal, da adesão de células tumorais a células alvo, a angiogénese num meio de células tumorais e a suscetibilidade de apoptose das células tumorais (Masaya e Hakomori, 2004).

### **2.2) Epidemiologia**

O estudo epidemiológico pode contribuir substancialmente para o conhecimento da origem do cancro. Para além dos estudos de incidência e mortalidade – epidemiologia descritiva – também se podem analisar as causas do cancro em função destas mesmas variáveis (incidência e mortalidade) – epidemiologia analítica.

A identificação de indivíduos que estejam em maior risco de cancro é uma etapa de elevada importância para a sua prevenção (Hussain e Harris, 1998). Assim, torna-se imprescindível a avaliação dos potenciais fatores de risco.

Tal como em outras doenças, estão associados ao cancro fatores genéticos e ambientais, havendo interações entre ambos, com conseqüente potenciação de efeitos. Estas interações variam não só entre os indivíduos mas, também, ao longo da vida do próprio indivíduo (Wild *et al.*, 2001).

Os fatores genéticos englobam genes com elevada penetrância, em que a doença se manifesta em quase 100% dos indivíduos com o alelo de risco. Em genes com baixa penetrância, este risco já não se encontra tão aumentado. Estes podem incluir polimorfismos ao nível dos genes que codifiquem para o metabolismo do agente carcinogénico e enzimas de reparação do DNA, assim como citoquinas e enzimas que atuem no metabolismo das hormonas sexuais (Wild *et al.*, 2001; Balmain *et al.*, 2003).

O retinoblastoma é o exemplo mais flagrante do papel da hereditariedade. Cerca de 40% dos retinoblastomas são situações familiares. A predisposição para este tumor mostra um padrão autossómico de hereditariedade. Portadores deste gene (mutado na linha germinal) têm um risco 10000 vezes superior de desenvolver a doença (usualmente bilateral) do que os que não o têm. (Cotran, R. Kuman, V. Collins, T. Pathological basis of disease. 6<sup>th</sup> ed. Saunders Company. 1999)

Os fatores ambientais englobam não só os fatores não-genéticos, assim como genéticos, uma vez que nos fatores genéticos o conceito de penetrância também se aplica a nível ambiental e penetrância ambiental também depende de fatores genéticos e ambientais (Wild *et al.*, 2001). Por exemplo, no caso de um indivíduo herdar um gene mutado que está envolvido na excisão de nucleótidos na reparação de xeroderma pigmentoso, o risco de cancro da pele está aumentado se estiver exposto à luz ultravioleta. Assim, a proteção à luz solar torna-se numa forma de prevenção (Hussain e Harris, 1998).

Nos últimos anos, a área da epidemiologia foi capaz de identificar vários fatores de risco ambientais para determinados cancros, como risco ocupacional, tabaco, radiação ionizante em elevados níveis e infeções específicas (Wild *et al.*, 2001).

O cancro é, então, uma patologia que pode se pode desenvolver em vários sistemas do organismo.

Segundo Kelly e Duggan (2002), o cancro gástrico é a segunda causa mundial de mortalidade, apesar de ter vindo a diminuir, seguindo-se o cancro do pulmão. No entanto, em países desenvolvidos, como os EUA, tem ocorrido um aumento do número de casos de cancro gástrico, e uma maior incidência em pessoas de raça branca. Dentro dos possíveis fatores encontram-se a infeção por *H. pylori*, associação desta com linfoma gástrico Não-Hodgkin, cirurgia gástrica, úlcera péptica, fatores dietéticos, frutas e vegetais, sal, radiação ionizante, tabaco e álcool.

Quanto ao cancro do ovário, em 1998 no Estado de Minnesota, estimava-se que 25000 mulheres teriam cancro do ovário e que, 14500 acabariam por morrer. Esta elevada taxa de mortalidade deve-se para além dos fatores associados, à falta de testes de triagem para um diagnóstico precoce. Vários estudos concluíram que uma elevada paridade e histerectomia protegiam contra o cancro, assim como o uso de contraceptivos (Beard *et al.*, 2000; Ristow *et al.*, 2006).

Um outro tipo de cancro é o cancro da laringe. Este é o segundo cancro respiratório mais comum depois do cancro do pulmão, e a sua incidência tem vindo a aumentar em todo o mundo, mais no sexo masculino que feminino. O aumento do número de casos está associado a factores como tabaco, álcool, factores dietéticos e nutricionais, exposição a químicos como gás mostarda e ácido sulfúrico (Cattaruzza *et al.*, 1996).

Também a neoplasia colorectal tem factores dietéticos associados, assim como, casos com doença inflamatória intestinal e presença de pólipos contribuem para o desenvolvimento desta patologia. Estas lesões afectam em mais de 30% da população de meia-idade e idosos, na Europa Ocidental (Matthew *et al.*, 1997).

Em países desenvolvidos, a segunda principal causa de morte nos homens é o cancro da próstata. O número de casos aumenta com a idade, mais que em qualquer outro tipo de cancro. Em cada ano 232090 casos nos EUA e 237800 na Europa são detectados. Quanto à mortalidade, cerca de 30350 nos EUA e 85200 homens na Europa morrem com cancro da próstata. Assim, tendo em conta estes números, é necessário um diagnóstico o mais cedo possível e tratamento adequado, como a radioterapia ou cirurgia radical (Hessels *et al.*, 2005).

## CAPÍTULO III: CANCRO DA BEXIGA

### 3.1) Epidemiologia

O cancro da bexiga é uma das neoplasias mais comuns, principalmente ao nível dos países desenvolvidos, estando em sétimo lugar no ranking mundial para os homens e em décimo sétimo para as mulheres (Colombel *et al.*, 2008). No entanto, a sobrevivência de mulheres com este cancro é menor relativamente aos homens (Kirkali *et al.*, 2005).

Em 2008 estimou-se a ocorrência de 386300 novos casos de cancro da bexiga e 150200 mortes. A maior incidência verifica-se no Egito, com a ocorrência de 37 casos por 100000 habitantes. Já em França, no ano de 2000, registou-se cerca de 10700 novos casos, em que 3,5% é a percentagem de mortes por cancro da bexiga. Em Marrocos este tipo de carcinoma foi o sexto mais diagnosticado no ano de 2005 (Ismaili *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos estima-se que haja 70530 novos casos e 14680 mortes por ano (Costantini e Millard, 2011).

Em Portugal, mais propriamente na Região Norte do país, foram diagnosticados 3984 casos de cancro da bexiga, entre 2000 e 2006, com uma taxa de sobrevivência relativa global de 75,9%, para uma média europeia de 72,4% (RORENO, 2011).

Apesar desta patologia poder ocorrer em pessoas jovens, mais de 90% dos casos ocorre em pessoas com idade superior a 55 anos (ilustração 1; Colombel *et al.*, 2008). A taxa de sobrevivência tem sido cada vez maior, graças à contínua pesquisa de terapêuticas, vigilâncias e avanços no que respeita ao diagnóstico (Plattner *et al.*, 2008).

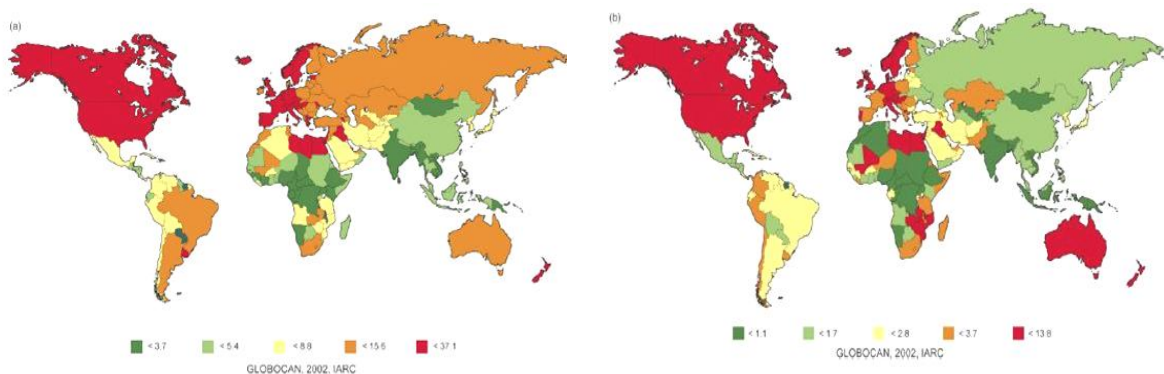


Ilustração 1: Taxa de incidência (por 100 000) do cancro da bexiga nos homens (a) e nas mulheres (b) (Colombel *et al.*, 2008).

### 3.2) Classificação do Cancro da Bexiga

O cancro da bexiga pode ser distinguido em três tipos, tendo em conta o tipo de células envolvidas: carcinoma das células de transição, carcinoma das células escamosas (epidermóide) e adenocarcinoma (National Cancer Institute, 2011).

O carcinoma de células transicionais é o mais comum correspondendo a cerca de 90% dos casos (National Cancer Institute, 2011). Este género de carcinoma aparece mais raramente em indivíduos jovens, com uma taxa inferior a 1% nas primeiras 4 décadas de anos de vida, sendo um assunto alvo de debate por parte de investigadores, na tentativa de saber se pacientes mais jovens têm melhor prognóstico que mais velhos (Yossepowitch e Dalbagni, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2004 realizou algumas mudanças no que respeita à classificação dos cancros da bexiga. Este sistema de classificação é recomendado para uso de rotina. Assim, o termo “urotelial” é apenas usado quando se pretende referir a tumores que derivam do revestimento epitelial da bexiga e não como proposto anteriormente, em 1999, o uso de “urotelial” ou de transição, pois o urotélio é único e não representa transição de um tipo de célula para outra (Humphrey, 2004).

O carcinoma epidermóide começa nas células escamosas, as quais, morfológicamente se caracterizam por serem finas e planas e formam-se na bexiga após infeção ou irritação prolongada (National Cancer Institute, 2011).

Finalmente, o adenocarcinoma ocorre nas células glandulares, que também se formam na bexiga após um longo período de irritação ou inflamação (National Cancer Institute, 2011). Surgem em dois locais comuns: na área basal da bexiga, que inclui o trígono e as paredes laterais adjacentes, e na cúpula da bexiga (Dandekar *et al.*, 1997). Estes tumores são mais comuns em homens que em mulheres, e atinge idades similares ao carcinoma urotelial (Young e Eble, 1991).

Os dois últimos tipos de cancro são menos comuns e ocorrem em aproximadamente 5% e 1% dos cancros da bexiga, respetivamente (Colombel *et al.*, 2008).

Tendo em conta a forma de crescimento e o seu comportamento biológico, o cancro pode ser classificado em superficial e invasivo. A maioria dos carcinomas são

superficiais (não invasivos) e só por vezes sofrem evolução para invasivo (Kawamura *et al.*, 2001).

Os carcinomas não invasivos podem ainda ser diferenciados em baixo grau e alto grau, tendo um comportamento biológico diferente e o seu prognóstico difere consoante o *status* do paciente. Esta classificação baseia-se na identificação de alterações moleculares, uma vez que, tratando-se de baixo grau, o tumor é geneticamente estável, ao contrário de um caso de alto grau, sendo geneticamente instável (Guey *et al.*, 2010).

### **3.3) Fatores de Risco**

O fumo do tabaco é um dos mais importantes fatores de risco, estando na origem de 50% dos casos nos homens e 35% nas mulheres. Os fumadores vêm o seu risco de cancro de bexiga acrescido em 2 a 4 vezes mais que os não fumadores, e este risco aumenta com a intensidade e duração do hábito de fumar. Caso se deixe este hábito, o risco de cancro decresce cerca de 30% após 1 a 4 anos e 60% após 25 anos (Colombel *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Moore *et al.* (2004), na Argentina, mostra a relação entre o tabaco e o risco de cancro da bexiga. Foram estudados polimorfismos nos genes GSTM1/GSTT1 e, também, nos genes MTHFR e NQO1, incluindo as duas variantes do gene MTHFR: a variante T no nucleótido 677 e a variante C no nucleótido 1298. Estes polimorfismos mostraram-se protetores para o cancro da bexiga quer em fumadores, quer em não fumadores.

Neste estudo, o polimorfismo no gene NQO1, na posição 609, no exão 6, foi estudado na relação com o cancro da bexiga e interação com o tabaco. Sabe-se que este gene protege contra o agente carcinogénico benzopireno (componente do fumo do tabaco), protege as células de sofrerem oxidação e previne a formação de espécies reativas de oxigénio. Ora, a existência de polimorfismo no exão 6 vai diminuir a atividade do gene NQO1 e aumenta o risco de cancro. Verificou-se, então, uma relação entre o genótipo do NQO1 e o fumo do tabaco para o risco de aparecimento de cancro da bexiga.

Estudou-se ainda a relação entre o metabolismo do carbono e o cancro da bexiga. Este metabolismo pode por um lado intervir nas reações de síntese de purina e timidina e, por outro, na produção de metionina e S-adenosilmetionina (SAM) para a síntese de proteínas e poliaminas, e reações de metilação. Verificou-se que indivíduos com

variantes polimórficas de MTHFR tinham um baixo risco de ter cancro da bexiga. A reduzida atividade do alelo TT677 está associado a uma diminuição de riscos de cancro, mas também a um risco aumentado para outros tipos de cancro, onde se encontra os do trato urinário. Isto pode dever-se a um fraco processo de metilação de DNA, promovendo a carcinogénese e, por outro lado, a redução dos riscos pode dever-se a uma maior disponibilidade de substrato por MTHFR, para a síntese de DNA.

Quanto ao gene GSTM1 e GSTT1, é responsável pela desintoxicação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, presentes, neste caso, no fumo do tabaco. No presente estudo verificou-se riscos acrescidos para fumadores portadores do genótipo nulo GSTM1/GSTT1, relativamente a fumadores com genótipo ativo correspondente. Descobriu-se que o genótipo nulo GSTM1 está associado a um aumento global de 40 a 50 % de risco de cancro na bexiga.

São vários os estudos que associam a exposição de aminas aromáticas, 2-naftilamina e arilaminas e o aparecimento de cancro da bexiga. Existe um longo período de latência entre a exposição inicial e o subsequente desenvolvimento deste tipo de tumor. Tipicamente, apesar de algumas exceções, são necessários 15 a 40 anos para a sua manifestação após o primeiro contacto com estes agentes carcinogénios. Assim, profissões nas quais a exposição a estes carcinogénio é aumentada, terão maior risco de desenvolver cancro da bexiga. São elas: pintores, trabalhadores em produtos que usam aminas aromáticas, camionistas e trabalhadores em indústrias de peles, borracha, tintas e alumínios (Landman *et al.*, 1998).

Estes potenciais fatores de risco devem-se principalmente ao facto de ocorrer polimorfismos nos genes GSTM1 e NAT2 nesta neoplasia. O gene NAT2 é um gene que codifica para a enzima 2 N-acetiltransferase, a qual assume funções na desintoxicação de aminas aromáticas por mecanismos de N-acetilação ou O-acetilação. Já o gene GSTM1 codifica a enzima glutathione S-transferase M1, que está responsável pela desintoxicação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e espécies reativas de oxigénio. O polimorfismo e a diminuição da atividade destas duas enzimas alteram a associação entre ingestão de alimentos com compostos carcinogénicos, como aminas heterocíclicas (HCA) e ingestão de antioxidantes com o risco de cancro da bexiga. Ainda no mesmo estudo, verificou-se que a ingestão de vitaminas B12, B6, B2 e retinol diminuía o risco de cancro, assim como um elevado consumo de vitamina C, vitamina

E e carotenóides, uma vez que estes compostos são antioxidantes e quimiopreventivos, estando, assim, relacionados com uma diminuição dos níveis de aductos de DNA na bexiga. Para além destes compostos, as frutas e vegetais contêm ainda fitoquímicos, substratos que podem induzir a enzima glutathione transferase. Desta forma, em indivíduos com genótipo nulo para GSTM1, seria benéfico o consumo destes alimentos (García-Closas *et al.*, 2007).

### **3.3.1) Outros Fatores de Risco**

A possível relação entre risco de cancro da bexiga e café tem vindo a ser estudada. Os resultados obtidos indicam uma associação positiva fraca, sendo então considerados ainda inconsistentes. Estes resultados podem ser devidos a resíduos do fumo do tabaco, já que beber café e fumar estão fortemente associados ou também porque as pessoas com risco elevado de ter cancro da bexiga ingerem mais café (Kirkali *et al.*, 2005).

Recentemente, um grupo de investigação do cancro da próstata (Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor (CaPSURE)), constatou um aumento de incidência do cancro da bexiga em homens com cancro da próstata, tratados com radioterapia (Colombel *et al.*, 2008). Este fator de risco também foi detetado num outro estudo caso-controlo de cancro da bexiga em mulheres que tinham recebido tratamento para o cancro do ovário. O risco de cancro da bexiga encontra-se aumentado em mulheres que receberam radioterapia e quimioterapia, do que em mulheres tratadas cirurgicamente. Em pacientes em que ambos os métodos foram adotados, o risco apresenta-se muito maior (Kirkali *et al.*, 2005).

O cancro da bexiga está também associado a infeções por *Schistosoma haematobium*. Este parasita encontra-se no topo das infeções transmitidas pela água e pode causar doenças como cistite, úlceras intestinais e vesicais, fibrose hepática, hipertensão portal, hepatoesplenomegalia, hidronefrose e, então, o cancro da bexiga. Neste caso há uma clara evidência da incidência de carcinoma do tipo espinocelular, contrariamente ao carcinoma de células transicionais. Pode ocorrer em toda a bexiga, mas raramente ocorre no trígono (Badawi, 1996).

### 3.4) Sintomas

Os sintomas associados ao cancro da bexiga são variados. Entre eles encontram-se a dor abdominal, presença de sangue na urina (hematúria), fragilidade e dores nos ossos, dores nas costas, fadiga, dor/dificuldade ao urinar (disúria), frequência urinária (polaquiúria), incontinência e perda de peso (National Cancer Institute, 2001; MedlinePlus, 2011). É importante distinguir bem estes sintomas, uma vez que são comuns a outras patologias e podem induzir a falsos diagnósticos, como por exemplo a presença de sangue na urina no cancro do colo do útero.

### 3.5) Diagnóstico

Em 1968, a Organização Mundial de Saúde (OMS), estabeleceu os quatro principais princípios para a deteção precoce da doença: a) a condição patológica em causa deve ser considerada um importante problema de saúde; b) deve haver um teste/exame adequado, válido, confiável, barato, fácil e de rápida execução; c) a eficácia desse mesmo teste deve ser satisfatória tendo em conta parâmetros como a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo; d) o historial natural da doença deve ser devidamente compreendido (Kirkali *et al.*, 2005).

Como visto anteriormente, a classificação do cancro consiste na avaliação das informações clínicas e histopatológicas, baseada no tecido originário do tumor. Mas, esta avaliação é subjetiva, podendo ser incompleta ou mesmo enganosa, para além de que existem várias morfologias do cancro e muitos tumores são atípicos. Estas dificuldades podem conduzir, em alguns casos, a um diagnóstico confuso, sendo importante o pedido de uma segunda opinião (Ramaswamy *et al.*, 2001).

A cistoscopia é uma técnica que permite a observação da bexiga através de uma sonda (cistoscópio). É um procedimento relativamente rápido, pouco traumático, necessitando apenas de anestesia local. Permite a identificação de quase todas as lesões papilares e, por este motivo, é um método confiável e usado rotineiramente para o diagnóstico do cancro da bexiga. No entanto, não deixa de ser um procedimento invasivo, causando algum desconforto nos pacientes (Simon *et al.*, 2002). De forma a reduzir o número de cistoscopias, testes urinários podem ser realizados para que seja possível a deteção de recorrências antes de os tumores se tornarem grandes e numerosos (Babjuk *et al.*, 2011).

A descrição cistoscópica deve incluir o local, o tamanho, o número e a aparência (papilar ou sólida) dos tumores, assim como a descrição de irregularidades das mucosas (Babjuk *et al.*, 2011).

A citologia é uma técnica utilizada quando se pretende detetar células do epitélio de transição no cancro da bexiga. Este método caracteriza-se por uma elevada sensibilidade e especificidade para a deteção de tumores de elevado grau. A desvantagem é que para tumores de baixo grau apresenta fraca sensibilidade, sendo apenas um método auxiliar à cistoscopia (Simon *et al.*, 2002).

Os métodos de diagnóstico não invasivos possuem várias aplicações e cada um deve ser analisado individualmente. Podem ser usados no *screening* de indivíduos do grupo de alto risco, no suporte de diagnóstico e prevenção de recorrências, e, principalmente, para diminuir o recurso a métodos invasivos, permitindo uma melhoria da qualidade de vida do paciente (Simon *et al.*, 2002).

O diagnóstico molecular é um método que se tem vindo a mostrar ser objetivo, preciso e de classificação sistemática de cancros. No entanto, não pode ser aplicado a todos os tipos de cancro já que ainda não foram identificados todos os marcadores moleculares (Ramaswamy *et al.*, 2001) e apesar de a maioria deste tipo de testes ter melhor sensibilidade que a citologia, a sua especificidade é baixa (Babjuk *et al.*, 2011).

A citometria de fluxo é um dos possíveis métodos de diagnóstico, não-invasivos, do cancro da bexiga. Esta técnica baseia-se no uso de amostras citológicas da bexiga e um corante fluorescente metacromático (laranja de acridina), de forma a ser possível marcar o DNA, o RNA e o tamanho dos núcleos no epitélio, sendo a quantidade de corante proporcional ao tamanho e à quantidade de DNA e RNA presente (Collste *et al.*, 1980; Palmeira *et al.*, 2007). A utilização da citometria de fluxo permite a diferenciação das células epiteliais benignas da bexiga, a partir de células escamosas e granulócitos. Os dados obtidos com esta técnica são de carácter objetivo e fornecem informações para um grande número de células em poucos minutos e sem grandes complicações no seu procedimento (Collste *et al.*, 1980).

A existência de um tumor na bexiga comprova-se ou pela presença de subpopulações distintas de células com conteúdo de DNA aneuplóide, ou pela ausência destas

subpopulações celulares, mas um aumento do número de células epiteliais de transição com mais do que um conteúdo de DNA diplóide (Collste *et al.*, 1980).

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose. Esta não é detetada na maioria dos tecidos normais, sendo expressa na presença de cancro. É baseada nesta sobexpressão que a survivina pode ser utilizada como um marcador molecular no cancro, nomeadamente no cancro da bexiga, em que se pretende métodos de diagnóstico simples, não invasivos e procedimentos simplificados. A deteção da survivina é um método baseado em anticorpos e que consiste na filtração de amostras de urina numa membrana de nitrocelulose, através de um aparelho de microfiltração. A confirmação é realizada através do Western blot, analisado para verificar a presença ou não de survivina, usando um anticorpo policlonal. Neste estudo, a sensibilidade do teste da survivina para a urina de indivíduos com cancro da bexiga ou recorrentes, foi de 100% e a sua especificidade para outras doenças do trato genitourinário neoplásicas ou não neoplásicas, foi de 95%. No entanto, estes valores variam consoante a população em estudo (Smith *et al.*, 2001).

Foi desenvolvido um teste, o (UCB)-ELISA Test®, que consiste na análise quantitativa, em duas etapas, demorando cerca de duas horas. Tem como objetivo a deteção das citoqueratinas 8 e 18 na urina. As citoqueratinas são proteínas dos filamentos intermediários presentes nas células epiteliais. Estas podem expressar citoqueratinas diferentes e quando há uma expressão exagerada de determinados tipos pode ter como origem a presença de cancro da bexiga. Este teste mostrou uma elevada sensibilidade, comparando com a citologia, 82% e 61%, respetivamente. Já os valores de especificidade não diferem muito (83% e 87%) (Simon *et al.*, 2002).

A hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) também pode ser usada como um meio para deteção de células cancerosas na bexiga. Esta tem mostrado uma maior sensibilidade, assim como especificidade, relativamente à citologia e citometria de fluxo na deteção do cancro da bexiga. O teste UroVysion Vysis (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) tem a capacidade de detetar um aumento anormal do número de cópias dos cromossomas 3, 7 e 17 e perdas do locus p16 em 9p21, presentes em tumores de baixo grau (Konety, 2006).

Nenhum teste pode substituir a cistoscopia. A citologia urinária ou os marcadores podem, então, ser usados como um adjuvante à cistoscopia, de forma a ser possível a detecção de tumores não detetados por esta técnica. Assim, deve ser usado um método com elevada sensibilidade e especificidade para tumores de alto grau (Babjuk *et al.*, 2011).

Após a realização dos primeiros testes de diagnóstico e se estes confirmarem a presença de cancro na bexiga, outros testes deverão ser realizados para verificar a extensão do tumor e assim fazer uma avaliação segundo a classificação “TNM”. Este sistema de classificação baseia-se na extensão do tumor primário (T), na condição dos nódulos regionais (N) e na ausência/presença de metástases (M). Este estudo anatomopatológico tem como objetivo auxiliar o clínico na decisão sobre qual o tratamento adequado, no prognóstico mais acertado, na avaliação dos resultados obtidos pelo tratamento aplicado, bem como facilitar a comunicação de informações e ajudar à investigação contínua do cancro. No fundo, é um sistema universal que permite a transmissão de informações, ausente de ambiguidade (Skinner, 1977).

Na ilustração 2 encontra-se a classificação TNM utilizada, segundo Bostrom *et al.*, 2010 e na ilustração 3 um esquema deste sistema de classificação e efeitos nos tecidos da bexiga; Knowles, 2005.

Description		Comments and additional information
<b>T: Primary tumor</b>		
Tx	Primary tumor cannot be assessed	–
T0	No evidence of primary tumor	–
Ta	Noninvasive papillary tumor	–
Tis	Carcinoma in situ, “flat tumor”	–
T1	Invades subepithelial connective tissue	Several additional substaging proposed [10–14]
T2	Invades <i>inner half</i> of muscle layer	T2a vs T2b substaging is suggested to be of no additional value if cases are controlled for nodal status [16–18]. Size of T2 tumors suggested to be a prognostic factor [18]
T2b	Invades <i>outer half</i> of muscle layer	
T3	Invades perivesical tissue <i>microscopically</i>	T3a vs T3b substaging is suggested to be of no additional value if cases are controlled for node status [19–21]
T3b	Invades perivesical tissue <i>macroscopically</i>	
T4	Invades prostate or uterus/vagina	Prostatic stromal invasion criteria needed for T4a staging [30]
T4b	Invades pelvic or abdominal wall	
<b>N: Lymph nodes</b>		
Nx	Lymph nodes cannot be assessed	Other proposed node staging classification proposed:
N0	No regional lymph node metastasis	
N1	Metastasis in single node ≤2 cm	Node density [23,24]
N2	Single (2–5 cm) or multiple nodes (<5 cm) affected	Aggregate lymph node metastasis diameter [26]
N3	Metastasis in node >5 cm	
<b>M: Distant metastasis</b>		
Mx	Distant metastasis cannot be assessed	–
M0	No distant metastasis	–
M1	Distant metastasis	–

Ilustração 2: Classificação TNM do cancro da bexiga (Bostrom et al., 2010)

## Antigénios Tumorais no Tratamento e Diagnóstico de Carcinomas



Ilustração 3: a) Esquema do sistema de classificação TNM; b) Urotélio normal; c) Células desorganizadas (displasia), elevado grau; d) Tumor papilar superficial de baixo grau; e) Tumor de elevado grau com invasão do tecido muscular (m) (Knowles, 2005).

Segundo a fonte MedlinePlus (2011) e a American Cancer Society (2011), a escala utilizada tem as seguintes características: 0 (Ta, N0, Mo) – tumores não invasivos, também chamados de carcinoma *in situ*. O tumor está confinado à camada de revestimento interno da bexiga, não invadindo o tecido conjuntivo ou muscular, nem se espalha pelos nódulos linfáticos e zonas mais distantes; I (T1, N0, M0) – o tumor cresce na camada de tecido conjuntivo que está sob a camada de revestimento da bexiga, mas não atinge a camada muscular. Também não se verifica metastização para nódulos linfáticos e locais distantes; II (T2a/T2b, N0, M0) – o tumor atinge a camada muscular, mas não a passa totalmente, não atingindo o tecido adiposo que envolve a bexiga. Não se espalha para nódulos linfáticos ou zonas distantes; III (T3a/T3b/T4a, N0, M0) – o tumor invade a camada muscular e atinge o tecido adiposo que envolve a bexiga. Também se pode metastizar para a próstata, útero ou vagina. Não há crescimento na parede pélvica ou abdominal, nem se espalha para nódulos linfáticos e locais distantes; IV (T4b, N0, M0 ou qualquer T, qualquer N, M1) – o tumor ou cresce através da parede da bexiga e na parede pélvica ou abdominal e não atinge nódulos linfáticos e locais distantes, ou então, espalha-se para os nódulos linfáticos e locais distantes como ossos, fígado e pulmões, ou seja, correspondendo a doença metastática.

Aproximadamente 5% dos pacientes com cancro da bexiga apresentam metástases no momento do diagnóstico (Fletcher *et al.*, 2011). Os locais mais comuns de aparecimento de metástases englobam os nódulos linfáticos regionais, ossos, pele, pulmões, fígado, cérebro e, menos recorrente, meninges, vagina e órgãos da cavidade peritoneal (Raghavan, 2000).

O tratamento é finalmente decidido e realizado segundo estas avaliações.

O risco de recorrências pode ser previsto segundo dados clínicos e patológicos, e depende de fatores como: o número de tumores presentes no momento de diagnóstico, a taxa de recorrência no período anterior (em 3 meses), o tamanho do tumor (quanto maior for, maior o risco de recorrência) e o grau de anaplasia de tumor (Oosterlinck *et al.*, 2002).

### **3.6) Tratamento**

#### **3.6.1) Cistectomia Radical**

A cistectomia radical é o tratamento padrão na maioria dos países, em pacientes com cancro da bexiga do tipo invasivo (Nieuwenhuijzen *et al.*, 2005), e a sua escolha é baseada em exames de cistoscopia e biopsia. De um modo geral, cerca de 94% dos pacientes sujeitos a cistectomia radical apresentam tumores na bexiga de elevado grau (Stein *et al.*, 2001).

Esta cirurgia pode incluir para além da remoção da bexiga, a remoção de órgãos adjacentes como a próstata e vesículas seminais no homem, e o útero na mulher. A parte distal da uretra também pode ser removida, o que tem sido alvo de alguma controvérsia. A dissecação regional dos nódulos linfáticos também é realizada, os quais fornecem informações importantes (Oosterlinck *et al.*, 2002).

O interesse em promover a qualidade de vida dos pacientes tem aumentado, de maneira que se começou a dar importância a tratamentos que promovam a preservação da bexiga, estando a cistectomia reservada a pacientes mais jovens e sem doença associada (Oosterlinck *et al.*, 2002).

#### **3.6.2) Quimioterapia**

A quimioterapia é um método de tratamento que tem sido usado desde há mais de 40 anos no cancro da bexiga metastático (Raghavan, 2000), tendo como principais objetivos o alívio dos sintomas, melhorar a qualidade de vida, assim como, a sobrevivência dos pacientes (Ismaili *et al.*, 2011).

A utilização da quimioterapia como neoadjuvante, isto é, pré-cirúrgica, tem sido um protótipo muito presente na área da oncologia, constatando-se melhorias nas taxas de

cura de alguns cancros. No entanto, em cancros do trato genitourinário estas melhorias são mais lentas. Este género de quimioterapia é vantajoso na medida em que permite o tratamento precoce de micrometástases sistémicas, a redução do estado patológico da doença primária e regional e uma avaliação da quimiosensibilidade *in vitro*. Ao mesmo tempo evita atrasos no tratamento sistémico devido a complicações do pós-operatório, o que tem elevada importância no cancro da bexiga, dado que cerca de 58% dos pacientes podem ter estas complicações após cistectomia radical, não permitindo, assim, a administração adequada de quimioterápicos (Constantini e Millard, 2011).

Uma outra possibilidade de tratamento sistémico de indivíduos com cancro da bexiga através da quimioterapia, é a quimioterapia adjuvante, ou seja, pós-operatória. Esta permite uma maior eficácia na remoção do tumor maligno e alívio dos sintomas, ao mesmo tempo que permite a avaliação da extensão do tumor, que muitas vezes é imprecisa (Constantini e Millard, 2001).

Os tumores das células transicionais (TCC) da bexiga apresentam sensibilidade aos agentes químicos. No entanto, a utilização de apenas um agente não fornece respostas favoráveis (Ismaili *et al.*, 2011).

A cisplatina é um dos fármacos mais ativos e que permite obter uma maior taxa de resposta global. Na ilustração 4, encontram-se outros fármacos que também são ativos no tratamento de tumores, como por exemplo a carboplatina. Esta não apresenta tão boa eficácia como a cisplatina, mas tem a vantagem de ser de fácil administração e melhor tolerada. Também a gemcitabina pode ser usada, em combinação ou com a carboplatina, obtendo-se baixos resultados, ou com a cisplatina, observando-se melhores respostas (Ismaili *et al.*, 2011). Além disso, é bem tolerada e pode ser administrada em idosos e em doentes crónicos com o mínimo de efeitos colaterais. Em estudos realizados, só se verificaram efeitos tóxicos em casos de grau 3 e grau 4, entre os quais destaca-se a neutropenia, náuseas, febre, hipocalémia e edema (ilustração 5; Stadler *et al.*, 1997).

Drogas	ORR
Cisplatin	33%
Methotrexate	29%
Doxorubicin	23%
5-fluoro-uracil	35%
Vinblastine	-
Cyclophosphamide	-
Mitomycine C	21%
Carboplatin	12-14%
Gemcitabine	24-28%
Paclitaxel	10-40%
Docetaxel	13-31%
Vinflunine	15%
Eribulin	38%

Ilustração 4: Fármacos que podem ser usados na quimioterapia e taxa de resposta correspondente (ORR) (Ismaili et al., 2011).

Toxicity	WHO grade 3	WHO grade 4
Neutropenia	1	1
Thrombocytopenia	1	0
Nausea/vomiting	2	0
Deep venous thrombosis	2	0
Fever	1	0
Hypokalaemia	1	0
Oedema	1	0

Ilustração 5: Efeitos secundários provocados pelo uso de gemcitabina em pacientes de grau 3 e grau 4 (Stadler et al., 1997).

A quimioterapia combinada é considerada a melhor escolha para o cancro da bexiga metastático (Fletcher *et al.*, 2011).

Desde 1990 que a combinação de metotrexato, vinblastina, doxorubicina e cisplatina (MVAC) é para muitos a terapêutica de 1ª linha no tratamento de tumores metastáticos (Ismaili *et al.*, 2011). No entanto, estão-lhe associados elevados níveis de toxicidade que levam a efeitos adversos como neutropenia, mucosite, náuseas e toxicidade neurológica (Inoue *et al.*, 2007). Alguns investigadores sugerem mesmo a suspensão do uso de MVAC como neoadjuvante e como adjuvante, exceto em casos de ensaios clínicos (Maeda *et al.*, 2007).

Um grupo de investigadores, o Western Oncology Group (SWOG), mostrou que três cursos de MVAC neoadjuvante antes de uma cistectomia radical, foram realizados com segurança e com taxas não muito elevadas de efeitos adversos, para além de um

aumento da sobrevivência dos pacientes com cancro da bexiga avançado, comparativamente aos pacientes que realizaram apenas cirurgia (Maeda *et al.*, 2007).

Géneros de quimioterapia mais recentes tentam reduzir a toxicidade provocada pelo MVAC, obtendo uma eficácia comparável ou superior no que respeita à sobrevivência global, taxas de resposta e tempo de progressão da doença (ilustração 6; Fletcher *et al.*, 2011).

	Sternberg et al. [7]	Sternberg et al. [7]	Von der Masse et al. [8]	Von der Masse et al. [8]	Ecke et al. [9]	Bellmunt et al. [10]	Bellmunt et al. [10]	Dogliotti et al. [11]	Dogliotti et al. [11]	Dreicer et al. [12]	Dreicer et al. [12]
Chemotherapy regime	MVAC	HD- MVAC + GCSF	MVAC	GC	GC + Pac	MVAC	M-CAVI	GC	Gem- Carbo	MVAC	Carbo- Pac
Response Rate (%)	58	72	45.7	49.4	64.7	52	39	49.1	40	35.9	28.2
Complete Response rate (%)	11	25	11.9	12.2	29.4	12.5	0	14.5	1.8	12.8	2.6
Median time to progressive disease (months)	9.6	11.1	7.4	7.4	7			8.3	7.7	8.7	5.2
Median survival (months)	14.1	15.5	14.8	13.8	18.5	16	9	12.8	9.8	15.4	13.8
Toxicity											
Grade 3 or 4 Neutropenia (%)	62	20	82	71	41.2			34.6	45.4	77	29
Neutropenic sepsis or febrile neutropenia (%)	26	10	12	1	32.4	18	3.2				
Drug-related deaths (%)	4	3	3	1		4	0			2.3	2.4

Ilustração 6: Quimioterapia de 1ª linha no cancro da bexiga metastático (Fletcher *et al.*, 2001)

### 3.6.3) Radioterapia

A radioterapia é um tipo de tratamento que, ao nível do cancro da bexiga, pode promover um tratamento paliativo da dor óssea resultante das metástases, o controle do avanço da patologia pélvica e a redução de sintomas do sistema urinário, como por exemplo a hematuria (Fletcher *et al.*, 2011).

A decisão sobre a utilização ou não deste tratamento é baseada nos fatores de prognóstico, na vontade própria do paciente e a avaliação do médico. Os pacientes sujeitos a radioterapia devem apresentar uma capacidade urinária adequada, um funcionamento correto da bexiga, não ter infeções urinárias recorrentes e inflamação ou cirurgia anterior da pélvis com adesão consecutiva (Oosterlinck *et al.*, 2002).

Apesar de ser um tratamento ativo e fornecer uma oportunidade de preservação do órgão, já que não é um procedimento cirúrgico, as taxas de controlo local e a sobrevivência têm sido pouco animadoras. Poderá ser resultado de uma má escolha de pacientes, de não haver um fornecimento da dose de radiação adequada para o tumor ou falha no tratamento de pacientes sem protocolos bem claros no que respeita à

conservação da bexiga, que incorporam a cirurgia e a quimioterapia (Logue e McBain, 2005).

Avanços na geração de imagens, planeamento computadorizado, radiação conformal tridimensional e verificação *on-line*, oferecem um melhor tratamento do cancro da bexiga músculo-invasivo, pois, desta forma, é possível uma seleção mais rigorosa dos pacientes e permite um melhor tratamento que facilita a administração de doses escaladas para o tumor e redução da irradiação de órgãos em risco. Como exemplo temos a ressonância magnética e a tomografia computadorizada (TC) (Logue e McBain, 2005).

Quanto às possíveis complicações que possam surgir com a radioterapia, a maioria dos pacientes poderá desenvolver enterite, proctite ou cistite, que normalmente são controladas sem grande dificuldade e autolimitadas. Efeitos tóxicos com elevada significância são menos comuns. A disfunção erétil ocorrerá em mais de dois terços dos pacientes do sexo masculino, contrariamente aos pacientes do sexo feminino que não vêm a sua função sexual comprometida (Ooterlinck *et al.*, 2002).

A cirurgia, radioterapia e quimioterapia devem ser pensadas como tratamentos complementares para o tratamento do cancro da bexiga. Em várias situações esta combinação originou resultados melhores do que quando isoladamente (Milosevic *et al.*, 2007).

Ultimamente a radiação tem sido frequentemente combinada com a quimioterapia no tratamento de cancro da bexiga músculo-invasivo, de forma a melhorar a eficácia local, impedindo o desenvolvimento de metástases e a aumentar a sobrevivência (Milosevic *et al.*, 2007; Logue e McBain, 2005).

#### **3.6.4) Imunoterapia por BCG**

Uma das terapias mais eficazes para o cancro da bexiga é a administração intravesical do bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Shah *et al.*, 2006).

Entre os anos de 1908 e 1921, os cientistas Calmette e Guérin iniciaram uma investigação com vista ao desenvolvimento de uma vacina anti-tuberculose. Foi realizada uma cultura altamente virulenta de *Mycobacterium bovis*, agente causador da tuberculose, e verificaram que a cultura foi perdendo virulência ao longo de várias

culturas durante 13 anos, que fez um total de 230 transplantes consecutivos de um disco para o outro. Ou seja, houve uma atenuação do vírus *M. bovis* que foi denominado de *M. bovis* Bacilo Calmette Guérin (BCG) (Brandau e Sttumann, 2007; Meijden e Sylvester, 2003).

Foi em 1929, com Pearl, que se observou a potencialidade da tuberculose ter algum efeito antitumoral, já que pacientes que sofriam de tuberculose apresentavam menos tumores malignos relativamente a um grupo controlo. Assim, o bacilo da tuberculose bovina atenuado mostrou ter uma resposta imunológica que conduz à eliminação de tumores malignos (Meijden e Sylvester, 2003).

Em 1969, o investigador Mathè revelou resultados bastante positivos do uso de BCG na terapêutica adjuvante para leucemia linfoblástica aguda, assim como uma regressão em melanomas (Bassi, 2002).

No ano de 1974, Zbar e Rapp formularam certas condições para obter um efeito antitumoral com BCG: deve ter capacidade de desenvolver uma resposta imune aos antigénios da micobactéria; deve haver um número adequado de bacilos vivos; um contacto próximo entre BCG e células tumorais e a carga de tumor deve ser pequena (Meijden e Sylvester, 2003).

Morates *et al.*, em 1976, desenvolveu um método eficaz para tratar cancro da bexiga sem invasão muscular através da instilação intravesical de BCG, sendo este superior a qualquer outro agente quimioterápico no que respeita à redução de recorrências e prevenção da progressão (Askeland *et al.*, 2012; Koskela *et al.*, 2012). Este procedimento é iniciado uma a três semanas após realização de RTU-V (cirurgia urológica transuretral e vesical) e é constituído por um ciclo de indução de seis semanas de cerca de 81 mg de BCG liofilizado, reconstituído em 50 mL de soro fisiológico. Após este ciclo, pode-se prosseguir com uma terapêutica de manutenção, dependendo do grau e estágio do tumor (Brandau e Suttman, 2007).

Após a instilação do BCG ocorre a ligação deste à fibronectina expressa sobre o urotélio, ocorrendo a internalização do *Mycobacterium* para células normais e malignas. Isto vai ativar o urotélio e conduzir ao desencadeamento de respostas inflamatórias na bexiga, ocorrendo a produção de várias citocinas pró-inflamatórias como o Il-1, Il-6, Il-8, Il-10 e TNF $\alpha$ . Segue-se a diferenciação de células T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> em T<sub>H</sub>1 e em T<sub>H</sub>2, que

direciona a resposta imune para a imunidade celular ou humoral, respetivamente, do qual depende o efeito terapêutico do BCG. A citocina IL-10 inibe a resposta imune de  $T_H1$  e IFN- $\gamma$  inibe a resposta imune do  $T_H2$ . Por outro lado, o bloqueio da IL-10 ou a indução de IFN- $\gamma$  pode levar a uma imunidade para  $T_H1$ , essencial à destruição de células cancerosas mediadas por BCG, no cancro da bexiga (Askeland *et al.*, 2012). Na imagem que se segue encontra-se todo este processo esquematizado.

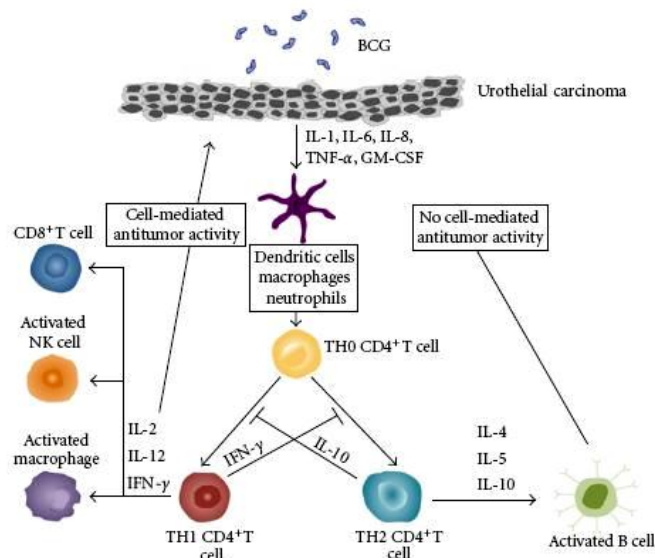


Ilustração 7: Cascata da resposta imune na mucosa da bexiga após instilação por BCG (Askeland *et al.*, 2012).

O impacto da terapia por BCG no carcinoma *in situ* foi observado num estudo SWOG: 64 pacientes foram tratados com BCG, dos quais 70% apresentaram resposta completa e de duração de cerca de 39 meses. Neste ensaio realizou-se também uma comparação à doxorubicina. Quarenta e cinco por cento dos pacientes tratados com BCG ficaram sem a doença ao fim de 5 anos, comparando com os 18% dos pacientes tratados com doxorubicina. Acrescentar que 64% dos pacientes que apresentaram resposta completa ao BCG ficaram livres da doença após 5 anos ou mais. Estes resultados tiveram um impacto significativo a nível clínico, permitindo a que a cistectomia radical deixasse de ser o tratamento inicial na maioria dos pacientes, podendo estes preservar a função normal da bexiga (Bassi, 2002).

Recentes estudos comprovaram que a terapêutica com BCG contribui para uma redução significativa de recorrências e progressão da doença em pacientes com alto risco de cancro da bexiga sem invasão muscular quando comparado com tratamentos

quimioterápicos. No entanto, 20% a 40% dos pacientes que não obtêm resultados com esta terapêutica podem resultar na progressão do tumor (Lima *et al.*, 2012).

Apesar dos resultados obtidos neste tipo de tratamento, ainda existem alguns pacientes que são intolerantes aos efeitos colaterais do BCG (sintomas locais de cistite, tais como disúria, alteração da frequência urinária e hematúria ocasional). Assim, estão a ser estudadas alternativas de imunoterapias como IFN- $\alpha$ , IL-2, IL-12 e IL-10 para atuarem como adjuntos com BCG ou então como uma terapêutica de substituição a solo (Askeland *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012).

### **3.7) Prevenção**

Segundo Colombel *et al.* (2008) e baseando-se no Grupo Internacional do Cancro da Bexiga (IBCG), existem algumas recomendações às quais se deve dar a devida atenção de forma a prevenir o aparecimento deste carcinoma ou a potenciar a sua cura. Entre elas encontram-se o incentivo dos pacientes a deixar de fumar, com a possibilidade recurso a programas específicos; monitorização de possíveis agentes carcinogénicos resultantes da exposição ocupacional; se o agente ocupacional for suspeito é importante identifica-lo corretamente, assim como, adotar medidas preventivas e avisar o departamento de saúde do local de trabalho em questão; deve haver um grupo interdisciplinar onde estão presentes urologistas e patologistas de forma a haver um entendimento no que respeita ao sistema de classificação a usar e um correto diagnóstico.

Uma outra medida preventiva seria a identificação dos grupos com maior suscetibilidade numa população e, desta forma, poder avaliar o risco acoplado e estabelecer níveis seguros de exposição (Wild *et al.*, 2002).

## CAPÍTULO IV: GLICOSILAÇÃO

A glicosilação é uma modificação pós-traducional de proteínas em organismos superiores. É um processo biológico que consiste na adição ou remoção de um ou mais glicanos (hidratos de carbono) a proteínas ou lípidos, formando um glicoconjugado (Campbell e Yarema, 2005), alterando a sua estabilidade e função (Gill *et al.*, 2010). Os glicoconjugados, dependendo da molécula alvo a que os glicanos se ligam, podem ser glicoproteínas, glicolípidos, proteoglicanos ou interações proteína-glicanos, como lectinas, glicosiltransferases e glicosidases (Li e Richards, 2010).

### 4.1) Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono são moléculas biológicas ubíquas na natureza (Wong, 1998), fazendo parte das quatro maiores classes de biomoléculas, juntamente com as proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Ghazarian *et al.*, 2011).

O termo “hidrato de carbono” surge pelo facto de os açúcares mais simples possuírem a fórmula empírica  $C_nH_{2n}O_n$ , em que  $n \geq 3$ , o que indica que os átomos de carbono se encontram combinados com moléculas de água (Ghazarian *et al.*, 2011).

Nos mamíferos, estas estruturas são constituídas por nove monossacarídeos, ligados entre eles por ligações glicosídicas, permitindo, assim, diferentes combinações. Estas ligações são realizadas essencialmente pelas glicosiltransferases e glicosidases. A interacção destas duas enzimas origina um amplo espectro de estruturas capazes de gerar vários sinais (Kim e Deng, 2008). Por esta razão, observa-se uma elevada heterogeneidade ao nível dos hidratos de carbono, também devida a certas características estruturais destas moléculas, ao tipo de ligação anomérica estabelecida, à posição da ligação e à presença, ou não, de ramificações (Mody *et al.*, 1995).

Esta complexidade a nível estrutural tem elevada influência nas diversas funções dos hidratos de carbono. Estes estão envolvidos em vários mecanismos como: desenvolvimento embrionário, diferenciação, crescimento, interações célula-célula ou célula-matriz extracelular, sinalização celular, interação entre agente patogénico e hospedeiro aquando de infeções, resposta imunológica, desenvolvimento de doenças, metástases, divisão celular e rigidez membranar (Ghazarian *et al.*, 2011; Kartal *et al.*, 2011).

As classes de hidratos de carbono mais importantes são as N-glicano e as O-glicano (Kim e Deng, 2008). Estes oligossacarídeos diferem ao nível da sua estrutura e estão abundantemente distribuídos na superfície das células, e associam-se a glicoproteínas, as quais assumem função na comunicação célula-célula. Esta comunicação entre células e o meio externo é de elevada importância, já que desta forma, é possível controlar aspetos de relevo relacionados com o comportamento celular (Dennis *et al.*, 1999).

A N-glicosilação é um processo que se realiza nos eucariotas e é essencial ao bom funcionamento e sobrevivência da célula (Patterson, 2005). Inicia-se por adição covalente de um oligossacarídeo com 14 resíduos de açúcar (percursor) à asparagina alvo de uma proteína (proteína core) (Ghazarian *et al.*, 2011). Este precursor é formado por um açúcar, associado a um lípido transportador – Dolicol – ligado à membrana do Retículo Endoplasmático. A molécula obtida após a ativação dos açúcares e de ser catalisada pela glicosiltransferase é Glc3Man9GlcNAc2 (Maia e Leite, 2001).

Após esta ligação, na Glc3Man9GlcNAc2 são removidos resíduos de glucose e alguns de manose, primeiramente no Retículo Endoplasmático e depois no Complexo de Golgi, onde outros monossacarídeos podem ser adicionados de forma a aumentar as cadeias N-glicano (Maia e Leite, 2001; Ghazarian *et al.*, 2011). O local preferencial para este processo ocorrer é onde se localiza a sequência destes três aminoácidos: Asn – Xaa – Ser/Thr, em que o segundo aminoácido pode ser qualquer um, à exceção de Pro (Li e Marc d'Anjou, 2009).

As alterações no Complexo de Golgi podem originar, então, as três maiores classes de oligossacarídeos N-glicanos: oligossacarídeos de alta-manose, complexos de oligossacarídeos e oligossacarídeos híbridos (Ilustração 7; Ghazarian *et al.*, 2011).

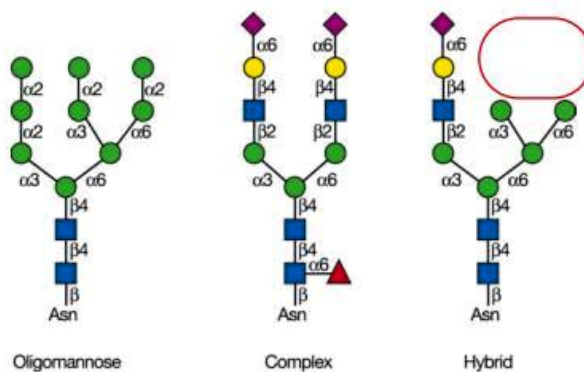


Ilustração 8: Tipos de N-glicanos (Varki *et al.*, 2009)

No que respeita à O-glicosilação, esta é um mecanismo que ocorre maioritariamente no Complexo de Golgi (Ghazarian *et al.*, 2011).

Os oligossacarídeos O-glicanos encontram-se ligados aos grupos hidroxilo dos resíduos de treonina e serina, da cadeia da proteína alvo, formando o antigénio Tn (Tarp e Clausen, 2008). Após esta adição do precursor N-acetilgalactosamina (GalNAc), o aumento da cadeia O-glicano pode proceder com a adição de resíduos de galactose, frutose, N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido siálico (Ghazarian *et al.*, 2011).

A O-glicosilação com a modificação de proteínas através de O-GlcNAc fornece uma modulação da atividade proteica, que pode ser realizada por vários mecanismos: por fosforilação (intervém ao nível da estabilidade e reversibilidade da proteína), regulação das interações proteína-proteína, regulação da degradação proteica, localização da proteína e regulação da transcrição (Ghazarian *et al.*, 2011; Bektas e Rubenstein, 2011).

Bektas e Rubenstein (2011) referem que, ao contrário da fosforilação, a O-glicosilação é catalisada por uma só enzima, e que a mesma é responsável pelas modificações em O-GlcNAc. Esta enzima que participa, então, na adição de GlcNAc às proteínas, foi isolada do fígado de ratos e denomina-se Uridina Difosfo-N-acetilglucosamina: Polipeptido  $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferase (O-GlcNAc transferase, OGT).

As modificações que possam ocorrer ao nível dos hidratos de carbono vão afetar as funções destes, acima referidas. Assim, a análise da expressão alterada de glicoproteínas associadas ao cancro permite a descoberta de biomarcadores, assim como uma possível terapêutica. Na ilustração 8 encontram-se alguns exemplos de glicoproteínas que já são usadas como biomarcadores (Kim e Misek, 2011).

Biomarker(a)	Glycosylation	Source	Disease
CA15.3	Yes	Serum	Breast
CA27-29	Yes	Serum	Breast cancer
HER2/NEU	Yes	Serum	Breast cancer
Fibrin/FDP	Yes	Urine	Bladder
CEA (carcinoembryonic antigen)	Yes	Serum	Colon cancer
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Yes	Serum	Colon, breast, lung, pancreatic
Epidermal growth factor receptor	Yes	Tissue	Colon cancer
CA19-9	Yes	Serum	Gastrointestinal
KIT	Yes	Tissue	Gastrointestinal tumor
$\alpha$ -fetoprotein(AFP)	Yes	Serum	Hepatoma, testicular cancer
Human chorionic gonadotropin- $\beta$	Yes	Serum	Testicular cancer
Thyroglobulin	Yes	Serum	Thyroid cancer
CA125	Yes	Serum	Ovarian
PSA (prostate-specific antigen)	Yes	Serum	Prostate

Ilustração 9: Glicoproteínas de várias amostras biológicas que podem ser usadas como biomarcadores no cancro (Kim e Misek, 2011)

#### 4.2) Mucinas

O termo “mucina” (MUC) foi usado para classificar membros de uma família de glicoproteínas de grandes dimensões que são os constituintes maioritários do muco (Adrianifahanana *et al.*, 2006).

A principal função das mucinas é proteger e lubrificar as superfícies epiteliais de certas zonas do organismo como o trato geniturinário, gastrointestinal e respiratório (Mukhopadhyay *et al.*, 2011; Kitamura *et al.*, 1996).

De uma forma geral, as mucinas podem ser classificadas, estruturalmente, em duas principais classes: as mucinas ligadas à membrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20) e as de formação de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 e MUC19). Estas apresentam algumas características estruturais comuns mas são distintas ao nível da sequência, domínio da organização, duração e número repetições das suas sequências (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Ao nível da biologia do cancro estas duas formas de mucinas podem ter efeitos opostos (Kim e Varki, 1997).

Considera-se que as mucinas são as principais portadoras de glicosilação alterada na grande parte dos carcinomas, para além de as suas interações moleculares definirem alguns fenótipos celulares de cancros com evolução para metástases (Kim e Varki, 1997). Assim, uma desregulação da expressão da mucina é uma das características verificadas em vários cancros, associadas à sua progressão que, por sua vez, influencia o crescimento celular, diferenciação, transformação, adesão, invasão e vigilância imunitária (Adrianifahanana *et al.*, 2006; Mukhopadhyay *et al.*, 2011).

#### 4.3) Lectinas

O termo lectina deriva do latim *legere* que significa escolher ou seleccionar. As lectinas são um grupo de proteínas que reconhecem e ligam hidratos de carbono a glicoproteínas e glicolípidos (ilustração 9). A interação das lectinas com determinados hidratos de carbono pode ser tão específica como a interação antigénio-anticorpo ou substrato-enzima (Ghazarian *et al.*, 2011). As lectinas podem interagir com monossacarídeos, mas esta ligação é relativamente fraca (Rabinovich *et al.*, 2007).

São bastante diversificadas, de origem não imune e estão distribuídas ubiquamente em plantas, animais e fungos. Participam num grande número de processos patológicos, com especial evidência no cancro (Fu *et al.*, 2011).

Inicialmente foram descobertas em plantas, mas no decorrer do tempo foram isoladas de microorganismos e animais (Sharon e Lis, 2004).

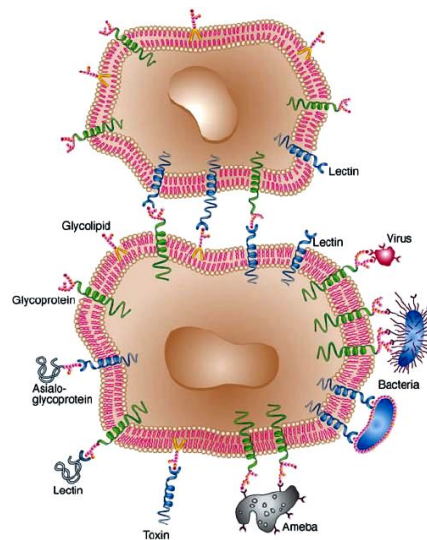


Ilustração 10: Interação entre lectinas e hidratos de carbono. As Lectinas atuam como um meio de adesão de diferentes células como os vírus, através dos hidratos de carbono (Sharon e Lis, 2004).

Estudos realizados em lectinas animais, mostram que o facto de as lectinas exercerem a função de ligação de hidratos de carbono se deve a resíduos de aminoácidos designados de CRD (Carbohydrate Recognition Domain). Estes reconhecem os resíduos terminais não redutores dos hidratos de carbono de glicoproteínas membranares e de glicolípido (Ghazarian *et al.*, 2011). Tendo em conta estes resíduos, as lectinas podem ser distinguidas em três grupos, merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas têm apenas um domínio de ligação de hidratos de carbono simples e as hololectinas possuem dois ou mais domínios que podem ser idênticos ou muito homólogos. Por fim, as quimerolectinas, são proteínas de fusão, formadas por um ou mais domínios de hidratos de carbono e não são relacionados (Jiang *et al.*, 2010).

Para além desta distinção, as lectinas podem ainda ser diferenciadas em duas famílias. São elas as do tipo C e as do tipo S. As do tipo C (CTLs) são as mais abundantes nos animais e engloba as selectinas, as colectinas e as lectinas endocíticas. As do tipo S são constituídas pelas galectinas (Ghazarian *et al.*, 2011).

As galectinas são uma família de proteínas em crescimento que estão amplamente distribuídas na natureza, desde os invertebrados inferiores até aos mamíferos (Nangia-Makker *et al.*, 2002). Caracterizam-se por terem elevada afinidade para  $\beta$ -galactósidos constituídos por glicanos e têm um CRD e uma dobra estrutural comum (Rabinovich *et al.*, 2007).

Pelo menos quinze galectinas já foram identificadas em mamíferos e exercem atividade em diversos processos biológicos como o *splicing* de mRNA, regulação e crescimento celular, adesão celular, modulação das interações célula-célula e célula-matriz, sinalização celular, embriogénese, inflamação, imunidade, apoptose, angiogénese e metástases de tumores (Li *et al.*, 2010; Ghazarian *et al.*, 2011; Chiariotti *et al.*, 1999). As galectinas são numeradas de acordo com a sua ordem de descoberta, da galectina-1 à galectina-15 (Le Mercier *et al.*, 2010), e as melhor estudadas são a galectina-1 e a galectina-3 (Nangia-Makker *et al.*, 2002).

As lectinas têm várias aplicações como por exemplo, na separação e identificação de células, na deteção, no isolamento e em estudos de glicoproteínas, na investigação de hidratos de carbono em células e organelos, histoquímica e citoquímica, mapeamento das vias neuronais, estimulação da mitose de linfócitos, seleção de lectinas resistentes e estudos de biossíntese de glicoproteínas (Sharon e Lis, 2004).

A associação destas proteínas solúveis ao cancro foi constatada, primariamente, numa investigação em que se observou a agregação das células cancerosas induzida pela asialofetúina, uma glicoproteína, e que extratos proteicos destas células induziram a hemaglutinação, na presença de galectinas certas (Dam *et al.*, 2005).

Mais tarde foi estudada a expressão da galectina-1 e da galectina-3 em linhas celulares de cancro de várias proveniências (Le Mercier *et al.*, 2010).

A galectina-3 é uma galectina mono-CRD, que é único e contém um curto domínio N-terminal de prolina, glicina e tirosina, fundido no CRD que posteriormente permite a formação de oligómeros (Le Mercier *et al.*, 2010). Está presente no citoplasma mas, dependendo do tipo de células e estados proliferativos, também pode ser encontrada na superfície celular, dentro do núcleo e no compartimento celular e atua como um recetor para ligandos contendo sequências de poli-N-acetilactosamina (Iurisci *et al.*, 2000).

Estudos mostram que a galectina-3 está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, inclusive no cancro, em fenómenos que englobam a angiogénese do tumor, o escape imune do tumor e migração de células tumorais (Le Mercier *et al.*, 2010).

As observações de maior importância são as que sugerem uma associação entre a progressão da galectina-3 e tumores e metástases. Por exemplo, células tumorais variantes que demonstram um elevado potencial para colonizar no pulmão, foram detetadas para expressar níveis acrescidos de galectina-3 na superfície celular. Ao mesmo tempo, um aumento da expressão desta galectina tem sido associado ao potencial metastático de vários tumores, provavelmente por afetar a motilidade celular e invadir matrizes extracelulares (Iurisci *et al.*, 2000).

Esta progressão neoplásica também se verificou ao nível da cabeça, pescoço, sistema gastrointestinal, tireoide e sistema nervoso central. No entanto, constatou-se que a expressão da galectina-3 está diminuída nos carcinomas do útero, mama e ovário, o que leva a concluir que alterações na expressão da galectina-3 podem afetar a interação de células malignas com células normais, pelos seus ligandos correspondentes, afetando o potencial de crescimento local e de metástases noutras locais do organismo (Ghazarian *et al.*, 2011), e que pode, assim, ter a função de supressor tumoral em alguns órgãos (Sakaki *et al.*, 2008).

No cancro da bexiga os níveis de galectina-3 também estão aumentados na maioria dos tumores, relativamente a níveis basais de amostras de bexiga normais. Assim, a galectina-3 poderá vir a ser usada como marcador do diagnóstico, prognóstico e para seleção da terapêutica (Sakaki *et al.*, 2008).

A galectina-1 é um dímero não covalente, formado por subunidades com um único CRD (Ito *et al.*, 2011).

Possui um elevado conteúdo em cisteína e é bastante expresso nos tecidos de muitos organismos vertebrados e invertebrados, requerendo uma rápida ligação a ligandos extracelulares, de forma a poder manter a atividade e estabilidade (Cedeno-Laurent e Dimitroff, 2012).

Os efeitos produzidos pela galectina-1 podem ser diferentes em vários tipos de células e dependem do tipo e do estado funcional das células. Estes efeitos podem ser mitogénicos, citostáticos ou de transformação (Chiariotti *et al.*, 1999). As suas

atividades podem por um lado estar relacionadas com as células T, em processos como apoptose, imunorregulação e evasão imune do cancro, e, por outro lado, não estar relacionadas com as células T, como a adesão celular, desenvolvimento de células B, *splicing* de mRNA, angiogénese, diferenciação do nervo e músculo e homeostase (Cedeno-Laurent e Dimitroff, 2012).

A expressão da galectina-1 tem sido detetada em órgãos imunes privilegiados e em diferentes tipos de tumores como astrocitoma, carcinoma da próstata, da tiróide, do cólon, da bexiga e do ovário (Rubinstein *et al.*, 2004).

Num estudo realizado por Yamaoka *et al.* (2000), mostrou-se que a inibição da expressão da galectina-1 de uma linhagem de células de glioma de rato detém o crescimento do tumor, sugerindo, assim, que a galectina-1 endógena tem função de promoção de crescimento.

A galectina-1 contribui, também, para a formação de metástases de tumores, estando desta forma envolvida com vários processos como alterações na adesão celular, aumento da capacidade de invasão, angiogénese e evasão da resposta imune, como se verifica na ilustração 10 (Rabinovich, 2005).

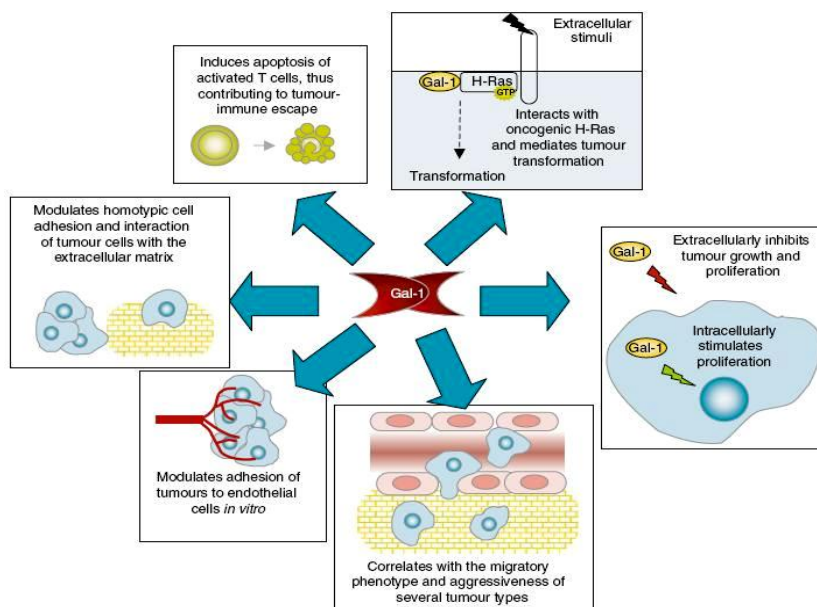


Ilustração 11: Contributo da galectina-1 na progressão de tumores (Rabinovich, 2005)

Relativamente ao cancro da bexiga, níveis bastante elevados de galectina-1 foram encontrados em tumores de alto grau comparativamente a células de bexiga normal ou tumores de baixo grau. Técnica como Western Blot e análise imuno-histoquímica de tecidos normais e neoplásicos, permitiram detetar valores mais elevados de galectina-1 em tumores (Cindolo *et al.*, 1999).

#### 4.4) Ácidos Siálicos

Os ácidos siálicos (Sias) são derivados do ácido neuramínico, no qual o grupo amino é substituído por um grupo acetilo ou glicolil (Narayanan, 1994). São monossacarídeos terminais, ligados a cadeias de glicanos de glicolípidos e glicoproteínas, isto é, glicoconjugados expressos na superfície celular dos tecidos de animais e microorganismos (ilustração 11). Visto que se situam, então, na parte terminal do glicano, as suas atividades são facilmente realizadas por interações. Assim, podem também ser parte dos locais de reconhecimento para a ligação de agentes patogénicos (Varki e Varki, 2007; Neu *et al.*, 2011).

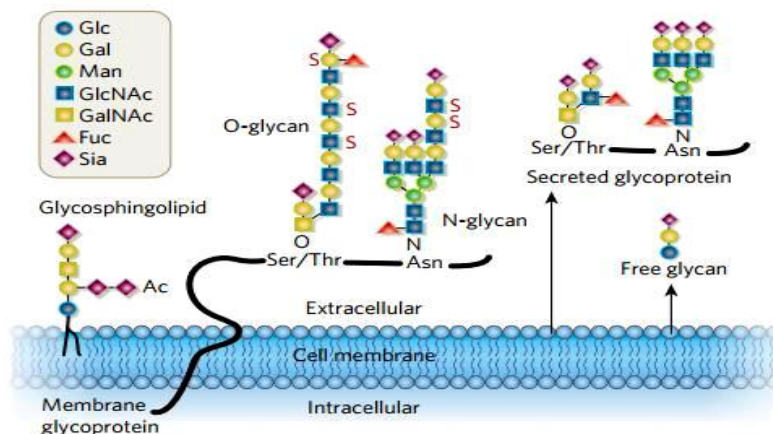


Ilustração 12: Ácidos siálicos na superfície celular e moléculas segregadas (Varki, 2007)

A cadeia de glicerol presente nos ácidos siálicos das mucinas do cólon humano é bastante O-acetilada, em mais de 50%. Este elevado nível de O-acetilação tem bastante importância já que regula a degradação de mucinas por enzimas bacterianas (Shen *et al.*, 2004).

Os ácidos siálicos participam em vários processos biológicos que incluem a regulação do sistema imunitário, desencadeamento de infeções e progressão de doenças (Varki e Varki, 2007).

Focando a sua estrutura, apresentam uma carga negativa, graças ao grupo carboxilo, e são constituídos por nove átomos de carbono. As variadas ligações que se podem estabelecer entre o átomo de carbono na posição 2 dos ácidos siálicos e os glicanos, juntamente com as corretas substituições ao nível dos átomos das posições 4, 5, 7, 8 e 9, originam uma elevada diversidade destes açúcares (ilustração 12; Varki *et al.*, 2009).

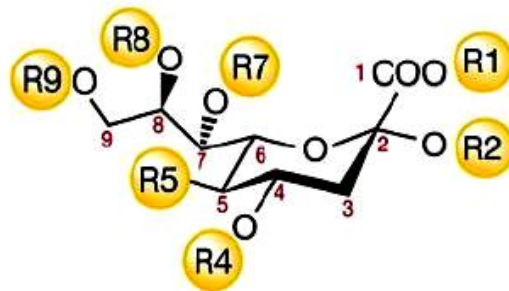


Ilustração 13: Possíveis substituições nos resíduos R (Varki *et al.*, 2009)

Os dois ácidos siálicos mais prevalentes nas células dos mamíferos são o ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) e o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). A principal diferença entre ambos é a presença de um átomo de oxigénio no grupo N-glicolil do Neu5Gc (ilustração 13).

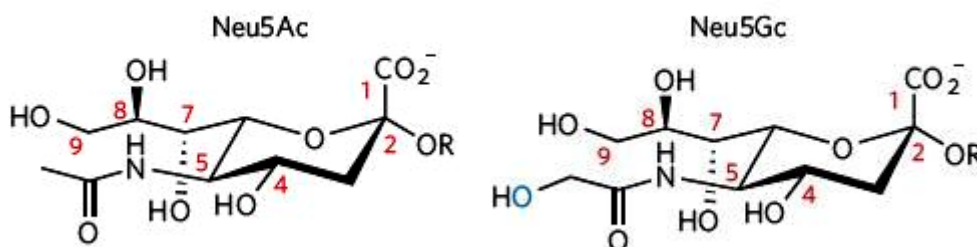


Ilustração 14: Ácidos siálicos mais comuns: Neu5GC e Neu5Ac (Varki, 2007)

Nos mamíferos, a transferência do ácido siálico do substrato dador CMP-Neu5Ac (ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato) para as cadeias laterais de oligossacarídeos de glicoconjugados é realizada por meio de sialiltransferases (Carvalho *et al.*, 2010).

Existem pelo menos 20 enzimas identificadas, das quais 15 foram clonadas a partir de amostras humanas (Harduin-Lepers *et al.*, 2001). Localizam-se no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi das células (Whaten *et al.*, 2003). Estas enzimas diferem tanto ao nível da especificidade do substrato como na expressão

tecidual. Dependendo, então, da sua natureza, podem catalisar diferentes ligações: a família ST3Gal ( $\alpha$ 2-3) catalisa a transferência de ácido siálico para resíduos de Gal ( $\beta$ -D-galactose), ST6Gal e ST6GalNAc ( $\alpha$ 2-6) para resíduos de Gal e GalNAc ( $\beta$ -D-N-acetilgalactosamina) e, por fim, a família ST8Sia ( $\alpha$ 2-8) catalisa a transferência de um a vários resíduos de ácido siálico para outros resíduos de ácidos siálicos (Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

A expressão alterada de sialiltransferases origina um aumento da expressão de glicanos sialilados, os quais estão associados à carcinogénese e à progressão do tumor (Carvalho *et al.*, 2010). Desta forma, tem vindo a aumentar um interesse considerável quanto à síntese e avaliação de inibidores destas enzimas (Whalen *et al.*, 2003). Por exemplo, no carcinoma do colo uterino,  $\alpha$ 2 - 6 mostra uma correlação positiva tanto para a oncogénese como para a formação de metástases tumorais no nódulo linfático pélvico (Wang, 2004).

Estas enzimas podem ser então usadas como biomarcadores para uma deteção precoce e melhoria de tratamentos em diversos tumores (Meany e Chan, 2011).

#### **4.5) Glicosilação Aberrante**

A alteração da glicosilação é considerada uma característica universal de células cancerosas (Kim e Varki, 1997; Hakomori, 2002).

A glicosilação aberrante é o resultado da uma transformação oncogénica inicial, sendo um importante impulsionador na indução da invasão e metástase (Hakomori, 2002). A glicosilação aberrante define, então, a fase, direção e o destino da progressão tumoral e a expressão de epítomos específicos de hidratos de carbono em certos tumores afeta o seu potencial invasivo e metastático (Numahata *et al.*, 2002). Pode surgir devido a alterações nas atividades das glicosiltransferases e glicosidases do complexo de Golgi e uma expressão aberrante destas enzimas pode conduzir a que células cancerosas produzam glicolípidos e glicoproteínas com glicanos alterados. Pode ainda dever-se a uma alteração da disponibilidade do substrato ou, então, por alterações nas sequências de aminoácidos das glicoproteínas (Campbell *et al.*, 2003; Meany e Chan, 2011). Estas alterações conduzem à expressão de antigénios carbohidratados associados a tumor (TACAs) (Cazet *et al.*, 2010).

O conceito da promoção ou inibição da progressão tumoral dependente da glicosilação tem vindo a ser desenvolvido em conjunto com estudos clinicopatológicos. A elevada expressão de alguns epítomos de glicosil promove a invasão e a metastização, conduzindo a uma diminuição da taxa de sobrevivência dos pacientes em 5 a 10 anos, enquanto que a expressão de outros epítomos de glicosil pode suprimir a progressão do tumor e, neste caso, a taxa de sobrevivência pós-operatória vai aumentar (Hakomori, 2002).

Assim, a existência de glicosilação aberrante associado à presença de tumor, permite a investigação e descoberta de biomarcadores, como por exemplo alterações nas glicosiltransferases/glicosidasas e os antigénios expressos à superfície das células cancerosas (TACAs).

#### **4.6) Antigénios Carbohidratados Associados a Tumor (TACAs)**

Num estudo realizado foi identificado um grupo de antigénios associados a tumor, graças à sua reatividade na presença de anticorpos e lectinas. Foram denominados de antigénios carbohidratados associados a tumor – TACAs (ilustração 14; Zhu *et al.*, 2009). Estes encontram-se expostos à superfície das células de cancro e estão correlacionados com as diferentes fases de desenvolvimento de cancro (Guo e Wang, 2009).

Muitos destes TACAs são estruturas sialiladas e o aumento geral da sialilação de glicoproteínas da superfície celular é comumente observado nos oligossacarídeos N-ligados e O-ligados das células tumorais (Cazet *et al.*, 2010).

Foi comprovado ainda que, tumores que expressam um elevado nível de TACAs estão associados uma maior progressão e número de metástases, ao contrário daqueles que têm baixos níveis destes antigénios (Hakomori, S., 2001). Assim, os TACAs não serão apenas marcadores tumorais, constituindo também um mecanismo essencial para a indução de metástases e no processo de invasão (Xu *et al.*, 2005). Desta forma, um elevado nível de antigénios associados a tumor expressos na superfície das células tumorais associa-se a um mau prognóstico para o paciente (Brocke e Kunz, 2002).

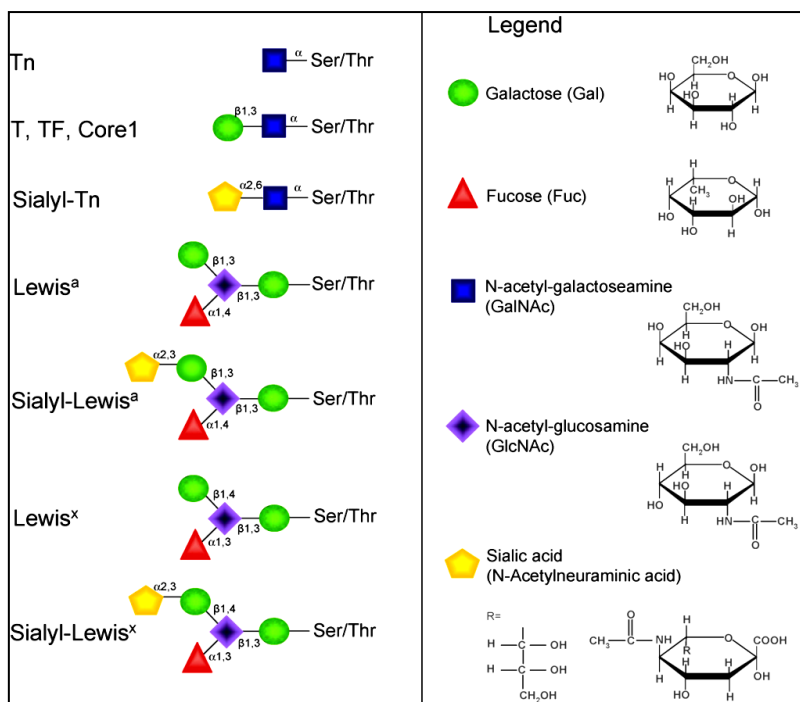


Ilustração 15: Estrutura dos Antigénios Carbohidratados Associados a Tumor (TACAs) (Schietinger *et al.*, 2008).

### I. Antigénios de Lewis

Os antigénios de Lewis são antigénios do grupo sanguíneo. A nível estrutural e biossintético são estruturas de hidratos de carbono, usados como marcadores na diferenciação celular e desenvolvimento embrionário (Ugorski e Laskowska, 2002).

A sua presença, nos adultos, não se limita só aos eritrócitos, podendo ser detetados em diferentes órgãos e tecidos (Ugorski e Laskowska, 2002).

Hakomori, S. (1996) refere que foi demonstrado que a uma alteração da expressão destes antigénios está associada uma transformação neoplásica, e que a essa mesma expressão está aumentada aquando da progressão do tumor e da aquisição do fenótipo maligno.

Em estudos realizados observou-se que o antigénio de Lewis<sup>y</sup> (Le<sup>y</sup>) mantinha alguma expressão em tecidos normais. No entanto, valores elevados da sua expressão em 60% a 90% dos carcinomas epiteliais e a manutenção dessa expressão nas respetivas metástases fazem deste antigénio um alvo atrativo para o desenvolvimento de imunoterapia tumoral (Ramsland *et al.*, 2004).

As estruturas de Lewis são formadas ou pela adição de Fuc( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ) a Gal( $\beta 1 \rightarrow 3$ )GlcNAc formando a estrutura do tipo 1 ( $Le^a$ ), ou então pela adição de Fuc( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ) a Gal( $\beta 1 \rightarrow 4$ )GlcNAc originando a estrutura do tipo 2 ( $Le^x$ ). Uma substituição suplementar de Fuc( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) no resíduo de Gal origina os antigénios  $Le^b$  ou  $Le^y$  (Ramsland *et al.*, 2004; Martensson *et al.*, 1995). Por outras palavras, os antigénios de Lewis podem ser formados pela adição de açúcares específicos a uma cadeia percussora de oligossacarídeos que pode ser ligada ou através de um glicolípido ou através de glicoproteínas (Green, 1989; Cazet *et al.*, 2010).

Os antigénios Lewis x ( $Le^x$ ) – 3-fucosil-N-acetil-lactosamina - como já referido, são antigénios do tipo 2 e acumulam-se muitas vezes em tecidos tumorais diferentes, sendo sintetizados na membrana celular (Ogana *et al.*, 1995).

Dentro do tipo 2 encontram-se ainda as formas sialiladas dos antigénios Lewis x ( $SLe^x$ ) [NeuAc  $\alpha 3$ Gal $\beta 4$ [Fuc $\alpha 1-3$ ]GlcNAc $\beta 3$ Gal $\beta 4$ -GlcCcr], presentes em tumores invasivos, mas ausente em tumores não invasivos, baseando num estudo realizado com 44 pacientes (Numahata *et al.*, 2002). Este tem sido mostrado como sendo um potencial ligando para as selectinas E, P e L (Muroi *et al.*, 1998; Hakomori e Zhang, 1997).

Tanto os antigénios  $Le^x$  como os antigénios  $SLe^x$  são expressos por células mielóides sendo que estes últimos são responsáveis pela ligação das células tumorais do pulmão, fígado e ovário ao endotélio (Muroi *et al.*, 1998; Ugorski e Laskowska, 2002).

Os antigénios  $Le^a$  e  $Le^b$  não são produzidos nos tecidos dos eritrócitos, mas antes noutros tecidos, sendo secretados para o plasma como glicolípidos e posteriormente incorporados na membrana de eritrócitos. Contrariamente aos antigénios  $Le^x$  e  $Le^y$ , que se encontram expressos em poucos tipos celulares (como certas células epiteliais) e não nas células sanguíneas, estes antigénios não são considerados boas escolhas para a imunoterapia devido a eventuais reações cruzadas prejudiciais que possam ocorrer com tecidos normais de muitos indivíduos do tratamento de grupo (Yuriev *et al.*, 2005).

Os antigénios Sialil-Lewis<sup>a</sup> ( $SLe^a$ ) foram descobertos num estudo usando o anticorpo monoclonal 19-9, por Koprowski *et al.* (1979) - daí o nome CA19-9 (antigénio carbohidratado) dado a este biomarcador tumoral.

A expressão destes antigénios, tal como os restantes, está associada à progressão tumoral, uma vez que foi observado um aumento gradual de SLe<sup>a</sup> durante a transformação e evolução neoplásica no cólon e reto (Ugorski e Laskowska, 2002). Estão ainda associados ao processo de formação de metástases (Yu *et al.*, 2004).

A sua expressão pode-se ver aumentada se ocorrer uma diminuição do nível de ácidos síalicos O-acetilados. Este aspeto foi comprovado num estudo realizado num cancro colo-retal (Shen *et al.*, 2004).

O antigénio sialilado de Lewis<sup>a</sup> é ainda responsável pela adesão das células cancerosas do cólon, pâncreas e gástricas ao endotélio, assim como está na origem da adesão celular no cancro da bexiga (Ugorski e Laskowska, 2002).

Atualmente, o CA19-9 é o único antigénio de Lewis a ser utilizado na rotina como biomarcador tumoral.

## II. Antigénios Thomsen-Friedenreich relacionados

Estruturas carboidratadas formadas por um dissacarídeo GalNac ou Galβ1-3GalNac glicosidicamente O-ligado à serina (Ser) ou treonina (Thr), bem como as suas substituições sialil, são coletivamente denominadas de antigénios Thomsen-Friedenreich relacionados (Dall'Ollio e Chiricolo, 2001). Estes são o resultado de uma síntese incompleta de O-glicanos (Buskas *et al.*, 2009).

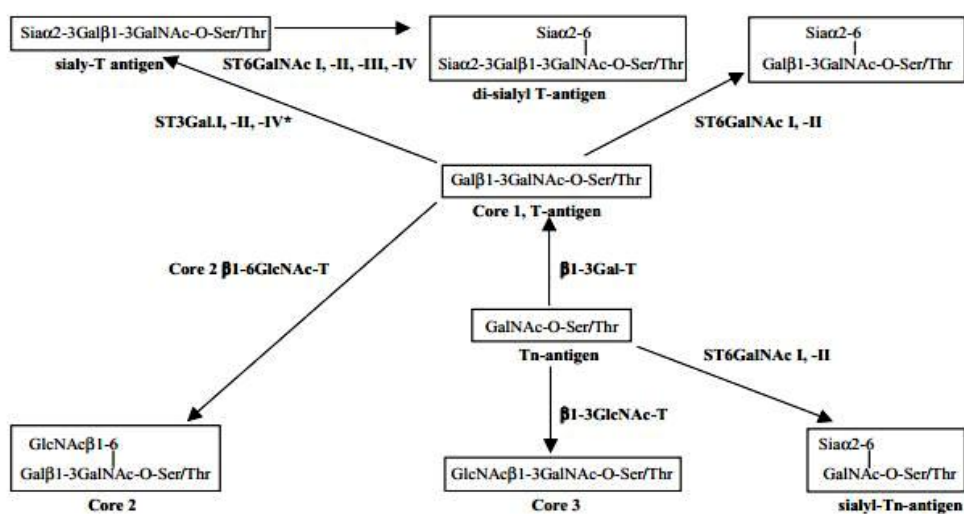


Ilustração 16: Esquema representativo da síntese dos antigénios Thomsen-Friedenreich relacionados (Dall'Ollio e Chiricolo, 2001).

Estes são antigénios associados a tumor, uma vez que tem sido detetada a sua presença em células tumorais de vários órgãos (Gambert e Thiem, 1997).

A expressão do antigénio T (também denominado de antigénio TF ou core 1), assim como a do seu precursor Tn, é restrita aos carcinomas, não existindo em tecidos normais, levando ao desencadeamento de uma resposta imunitária do organismo humano (Xu *et al.*, 2005). Esta expressão verifica-se em mais de 80% dos carcinomas e ocorre em várias superfícies de glicoproteínas e mucinas (Ju *et al.*, 2008). São considerados ainda potenciais ligandos para galectinas humanas endógenas (Bian *et al.*, 2011).

Quer o T, quer o Tn podem ser sialilados. Para isso, a sialiltransferase ST6GaINAcI vai catalisar a transferência do ácido siálico para o antigénio Tn, originando, assim, o antigénio sTn. Por outro lado, na presença da sialiltransferase ST3GaII e III ocorre a catálise da transferência do ácido siálico para o antigénio T, obtendo-se o antigénio sT (Ikehara *et al.*, 1999).

Normalmente, os tumores expressam os antigénios T, Tn e sTn simultaneamente. No entanto, há uma heterogeneidade no que respeita à localização celular e quantidade de cada um (Itzkowitz *et al.*, 1989).

O antigénio T tem sido alvo de estudo na questão da adesão de células tumorais e invasão tecidular. Foram detetadas grandes quantidades deste antigénio em membranas de superfície externa do cancro da mama, tornando-o, assim, num alvo atraente ao desenvolvimento de futuras terapêuticas e métodos de diagnóstico (Glinsky *et al.*, 2000). Esta adesão celular e tecidular é essencial para o processo de invasão e metastização do carcinoma, que inclui as fases aderentes e proliferativas (Springer 1997).

A sua expressão verificou-se ao nível dos carcinomas da mama, do cólon, bexiga, próstata, fígado e estomago (Heimburg-Molinario *et al.*, 2011). Sabe-se também que a expressão do antigénio TF está correlacionada com a formação de metástases ao nível do fígado aquando da presença de carcinoma no cólon (Kumamoto *et al.*, 2001).

Em alguns tumores, os antigénios T (ou TF) estão mascarados pelo ácido siálico, dando origem ao antigénio sialil-T (ST). Esta sialilação é feita pelas enzimas sialiltransferases, cuja expressão está frequentemente desregulada nos tumores (Dall'Olio, 2001). No carcinoma da bexiga, alguns estudos correlacionam o T com bom prognóstico, (Dobrowolski *et al.*, 1995; Dow *et al.*, 1989) mas outros correlacionaram-no com pior prognóstico (Langkilde *et al.*, 1992; Langkilde, 1995).

O antigénio Tn foi descoberto no ano de 1957, e foi denominado de “antigénio T nouvelle” ou Tn por Moreau *et al.* para diferenciar do antigénio T (TF), descoberto, então, anos antes (Heimburg-Molinari *et al.*, 2011).

O antigénio sTn tem um papel de bastante relevo no que respeita ao fenótipo das células do carcinoma, tendo a capacidade de alterar vivamente vários processos relacionados com a doença. Assim, pode induzir a um comportamento mais agressivo das células como a diminuição da agregação celular, um aumento da adesão à matriz extracelular, migração e invasão (Pinho *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Ju *et al.* (2008) diz que a expressão da T-sintase (enzima cuja atividade influencia a expressão de antigénios Tn) está mediante controlo de uma chaperona *Cosmc*. A existência de uma mutação no gene *Cosmc* leva a uma perda de atividade da T-sintase e conseqüente aumento da expressão dos antigénios Tn e sTn na superfície das células tumorais.

A expressão do antigénio nas células tumorais está também aumentada quando há um acréscimo do transportador UDP-Galactose (Kumamoto *et al.*, 2001).

A expressão de sTn foi verificada em vários tipos de cancro dos quais se destaca o cancro da mama, cancro gástrico, cancro do pâncreas, cancro colo-rectal, bexiga e cancro dos ovários (Pinho *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1997). Em pacientes com estes tipos de cancro está associado um mau prognóstico, já que o poder de formação de metástases está aumentado (Miles *et al.*, 1994).

Este antigénio é específico de mucina e pode ser considerado uma variável independente no que respeita ao prognóstico da sobrevida global de pacientes com cancro colo-retal. Assim, o antigénio sTn pode ser um importante fator que permitirá que pacientes possam beneficiar de uma terapêutica adicional. Para além disto, este estudo, menciona a possibilidade da clonagem de um gene para o intestino humano,

facilitando futuros estudos ao nível da função biológica da mucina no cancro do cólon (Itzkowitz *et al.*, 1990).

Dado que estes antigénios são fortemente expressos na superfície celular de tumores e têm a capacidade de desencadear respostas imunes celulares e humorais, faz com que estas estruturas sejam uma forte razão para o desenvolvimento de uma vacina eficaz (Cao *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1996). Também Xu *et al.* (2005) refere a mesma potencialidade acrescentando ainda a vantagem destes antigénios serem de pequeno tamanho e terem uma elevada expressão durante as primeiras fases de transformação dos tumores acima mencionados.

## **CAPÍTULO V: IMUNOTERAPIA**

### **5.1) Sistema imunitário e desenvolvimento de vacinas**

De uma forma geral, o sistema imunitário pode ser definido como uma complexa rede de órgãos, tecidos e células que atuam de forma conjunta para defender o organismo. Assim, quando um agente estranho ao organismo o invade, o sistema imunitário reconhece esse mesmo agente como estranho, destruindo-o. O sistema imunitário tem ainda uma capacidade de memória que, quando o agente estranho invade novamente o organismo, este reage de imediato, impedindo o desenvolvimento de infecção (National Cancer Institute, 2011).

A imunidade inata, ou não específica, representa a primeira barreira a uma infecção e tem um papel fulcral na indução da imunidade adaptativa (Kovarik e Siegrist, 1998). É um fenómeno natural que ocorre em todos os indivíduos, obtendo-se resultados imediatos (LaRousse, 1998). Esta atua por reconhecimento de estruturas moleculares altamente conservadas, específicas de agentes microbianos (PAMPs – padrões moleculares associados a patogénicos), através de um conjunto de recetores padrão de reconhecimento (PRRs) (Pasare e Medzhitov, 2004).

A imunidade adquirida, ou específica, tem como função o reforço da anterior, especialmente em casos de invasão microbiana. Nesta situação, existe um conjunto variado de recetores dotados de capacidade para reconhecerem um largo espectro de antigénios. São os recetores de células T (TCR) e recetores de células B (BCR). Os variados PRRs estão envolvidos em mecanismos como a opsonização, cascata do complemento, fagocitose, etc. (Pasare e Medzhitov, 2004).

A imunidade adquirida caracteriza-se pela especificidade e pela memória, sendo mediada por linfócitos T e B. Os linfócitos T passam para a corrente sanguínea e de seguida para os tecidos onde atacam o agressor – imunidade celular. Os linfócitos B mantêm-se nos gânglios, transformando-se em plasmócitos, que segregam anticorpos que se vão fixar ao antigénio – imunidade humoral. Este tipo de imunidade é ainda influenciado pela produção de células T-helper ( $T_H$ ) e consequente produção de citocinas. As células  $T_H$  quando estimuladas pela presença de antigénios nas células apresentadoras de antigénios (APCs), diferenciam-se em  $T_{H1}$  e em  $T_{H2}$ . As células  $T_{H1}$  segregam o interferão  $\gamma$  (IFN -  $\gamma$ ) e promovem a imunidade celular. Já as células  $T_{H2}$

produzem interleucinas (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), promovendo a imunidade humoral (Akira *et al.*, 2011; LaRousse, 1998). Ao mesmo tempo, são produzidos linfócitos de memória, T e B, permitindo uma reação muito mais rápida e eficaz, no caso de uma segunda invasão. É neste pressuposto que se baseia a vacinação (LaRousse, 1998).

Atualmente, a única terapêutica baseada no sistema imunitário que é aplicada ao carcinoma da bexiga é a instilação pelo BCG, mencionada anteriormente. No entanto, a glicosilação aberrante de glicoproteínas e glicolípidos de células cancerosas tem sido explorada no sentido de desenvolvimento de novas imunoterapias para o cancro. Particularmente, avanços ao nível do conhecimento da cooperação existente entre sistema imunitário inato e adquirido permitiu uma nova abordagem na idealização racional de vacinas (Li *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de vacinas com o intuito de estimular o sistema imunitário, para que este reaja à expressão de antigénios, é uma forma ideal para controlar uma doença, em especial o cancro (Heimburg-Molinero *et al.*, 2011).

## **5.2) Imunoterapia baseada em TACAs**

Ao longo de duas décadas, vários laboratórios têm trabalhado com o objetivo de conseguir desenvolver, vacinas anti-tumorais eficazes, baseadas em hidratos de carbono, de forma a estimularem o sistema imunitário para identificar e eliminar células de carácter canceroso e metastático (Zhu *et al.*, 2009).

O antigénio TF foi descoberto graças à presença de anticorpos específicos no soro humano. Este antigénio foi exposto numa cultura de células do sangue contaminada e, quando se tentou determinar o grupo sanguíneo (ABO) do paciente, verificaram que ocorria hemaglutinação em todos os soros. Este fenómeno tornou-o um alvo para o desenvolvimento de uma vacina. Por outro lado, uma vez que o anticorpo TF foi já encontrado em pessoas sem patologia, significa que este não causará nenhuma reação adversa no paciente e também que os humanos não são tolerantes ao antigénio TF (Heimburg-Molinero *et al.*, 2011; Springer, 1997).

A primeira tentativa de criar uma vacina para o cancro, baseada nos antigénios TF, surgiu em 1995 com um grupo de cientistas de Georg Springer. Um dos estudos consistiu na vacinação de 32 pacientes com uma vacina constituída pelo antigénio TF derivado de neuraminidase e com um adjuvante  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  e vacina de *Salmonella typhi*,

a qual expressa estes mesmos antigénios. Verificou-se que ao fim de longos anos com repetidas vacinações, todos os pacientes sobreviveram mais de 5 anos (Heimburg-Molinaro *et al.*, 2011).

Um outro ensaio realizado pelo mesmo grupo envolvia 19 pacientes portadores de cancro da mama, divididos em diferentes fases: 6 pacientes na fase IV, 6 na fase III e 7 na fase II, os quais foram vacinados por via intradérmica. Verificou-se que 3 dos pacientes da fase IV, 3 da fase III e 5 da fase II, ou seja, 11 pacientes, sobreviveram mais de 10 anos e todos os pacientes sobreviveram mais de 5 anos de pós-operatório. (Springer *et al.*, 1995).

Este número pode não ser muito significativo, mas leva a crer que uma investigação mais aprofundada em vacinas anti-TF pode trazer resultados bastante benéficos ao nível da imunoterapia para cancros, em especial ao cancro da bexiga.

A expressão de antigénios de Lewis sialilados x e a (sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup>) pode ser estudada e explorada para a diferenciação entre células normais e células cancerosas. Desta forma, podem ser utilizados como biomarcadores no diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas para tumores que expressam estes mesmos antigénios (Heimburg-Molinaro *et al.*, 2011).

Foram detetados anticorpos anti-sLe em pacientes com melanomas que expressam estes antigénios, demonstrando, assim, que estes antigénios são imunogénicos. Mas, esta resposta por parte do sistema imunitário não é suficiente para combater o tumor. Para isso é necessário aumentar a resposta imunológica com tratamentos específicos, como as vacinas (Ravindranath *et al.*, 1997).

Foi realizado um estudo por Ravindranath *et al.* (1997) que consistiu na indução de uma reação imunogénica em pacientes com melanoma. Foi injetada uma vacina de células de melanomas que expressam sLe<sup>x</sup>. Ora, este antigénio encontra-se em maiores proporções nas células de melanoma relativamente aos melanócitos normais. Assim, a ligação e a agregação das células humorais aos anticorpos gerados está facilitada, induzindo uma resposta de forma a erradicar as células tumorais. Por outro lado, uma densidade mais baixa nas células normais previne uma reação patológica com estes anticorpos. Obteve-se uma resposta para anticorpos anti-Le<sup>x</sup> IgM, que proporcionou a indução do complemento, na citotoxicidade dependente de anticorpos, na opsonização de células

tumorais, e também no impedimento da ligação de ligandos a antigénios livres que podem ter propriedades imunossupressoras.

Quando as vacinas são administradas juntamente com adjuvantes (derivados de BCG - *Mycobacterium bovis* – de MPL - *Salmonella minnesota* R595 – ou MCV – vacina de células de melanoma), há uma perda total de antigénio sLe<sup>x</sup> na superfície das células tumorais, conduzindo a uma diminuição do tumor.

De realçar ainda a importância da descoberta na qual pacientes cuja indução de IgM foi maior que IgG tiveram um melhor prognóstico, comparativamente ao oposto.

Bukas *et al.* (2009) enumera algumas dificuldades quanto ao uso de TACAs em vacinas. Em primeiro lugar, o antigénio carbohidratado a ser usado deve encontrar-se em quantidades suficientes, deve ser portador de elevada pureza e ter uma integridade a nível estrutural. No entanto, isolar o antigénio a partir de material natural pode ser uma tarefa árdua devido à heterogeneidade da glicosilação na superfície celular. Este problema pode ser contornado melhorando os métodos de síntese de oligossacarídeos através de mecanismos mais sofisticados como um sintetizador automático de oligossacarídeos e um pós-síntese. Desta forma, obter-se-á antigénios homogéneos de oligossacarídeos dotados de elevada pureza, com uma integridade estrutural incontestável e em grandes proporções. Em segundo lugar, aumentando a resposta imune contra os hidratos de carbono vão associar-se dificuldades devido à natureza das células-T independentes. Assim, uma resposta a este tipo de antigénios é diferente de uma resposta a proteínas e péptidos fazendo com que a afinidade dos anticorpos IgM seja baixa e de curta duração, ocorrendo, assim, uma falha de memória e não indução de células-T.

O facto de alguns TACAs poderem estar presentes em células normais (mesmo que em concentrações reduzidas), faz com que o sistema imune acabe por oferecer tolerância tornando a sua antigenicidade baixa. Desta forma, a indução de anticorpos IgG contra TACAs é muito mais difícil do que a indução de anticorpos semelhantes contra antigénios virais e bacterianos carbohidratados. Têm sido feitos esforços na tentativa de melhorar esta situação da imunotolerância como, por exemplo, melhorar a apresentação dos antigénios TACAs, induzindo respostas de anticorpos específicos e relevantes.

### 5.3) Imunoterapia MUC1

A mucina MUC1 é uma glicoproteína de alto peso molecular e localiza-se na superfície luminal de células epiteliais polarizadas. Esta contém um domínio extracelular constituído por um número variável de repetições de 20 aminoácidos, um número considerável de O-glicosilação, um domínio transmembranar e um domínio intracelular curto, onde se encontram locais para potenciais fosforilações (Disis, 2006).

Esta glicoproteína é expressa em vários cancros epiteliais, demonstrando padrões aberrantes de glicosilação, caracterizados por uma sobre-expressão e hipoglicosilação, nomeadamente ao nível dos tumores colo-retais (75 a 100%). Assim, a MUC1 é um forte candidato na indução de respostas imunes específicas de tumores (Disis, 2006; Silk *et al.*, 2009;

Estudos revelaram ainda que a MUC1 tem sido usada em ensaios clínicos humanos e estes têm demonstrado que a imunoterapia baseada na MUC1 é benéfica, protegendo os pacientes de recorrências de até oito anos em doentes com cancro da mama precoce (Li *et al.*, 2010).

## **CAPÍTULO VI: CONCLUSÃO**

Finalizado o presente trabalho, foi clara a importância que a glicosilação assume no desenvolvimento de neoplasias. Este processo é primordial para a formação de proteínas, já que consiste na adição de hidratos de carbono a cadeias proteicas, originando, assim, um glicoconjugado. Pode ainda ser distinguida em dois tipos: a N-glicosilação e a O-glicosilação.

Alterações que possam surgir nos hidratos de carbono podem conduzir a modificações nas funções dos mesmos, como por exemplo na diferenciação celular, no crescimento celular, interações célula-célula, na resposta imune, entre outros. Assim, a análise destas alterações, isto é, o resultado de uma glicosilação alterada, permitirá a identificação de possíveis biomarcadores, que podem, posteriormente, ser usados na investigação e desenvolvimento de terapêuticas.

Neste trabalho destaca-se a influência de mucinas, lectinas, ácidos siálicos e ainda dos TACAs, expressos aquando de uma glicosilação aberrante. Existem estudos nos quais se comprova a sua influência ao nível da evolução da doença oncológica, nomeadamente o cancro da bexiga.

Os antigénios carbohidratados associados a tumor têm sido alvo de várias investigações uma vez que tumores cuja expressão em TACAs é elevada, têm-lhe associado uma maior progressão e metastização. Dentro destes destacam-se os antigénios de Lewis e os antigénios Thomsen-Friedenreich.

Desde há cerca de duas décadas que são realizados inúmeros estudos com o intuito de desenvolver vacinas para tumores que expressam estes antigénios e com resultados benéficos para o paciente. O desenvolvimento, então, de uma vacina baseada em TACAs pode ser uma nova esperança a doentes oncológicos, em especial com cancro da bexiga, já que é uma das neoplasias mais comuns a nível mundial, podendo, assim, ser uma opção à imunoterapia baseada em BCG ou outros métodos de tratamentos mais agressivos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Andrianifahanana, M., Moniaux, N., Batra, S. K. (2006). Regulation of mucin expression: Mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1765, pp. 189 – 222.
2. Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2011). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Publishing Group*, 2, pp. 675 – 680.
3. Askeland, E. J., Newton, M. R., O'Donnell, M. A., Luo, Y. (2012). Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Advances in Urology*, 2012, pp. 1 – 13.
4. Babjuk, M., Oosterlinck, W., Sylvester, R., Kaasinen, E., Bohle, A., Palou-Redorta, J., Rouprêt, M. (2011). EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *European Urology*, 59, pp. 997 – 1008.
5. Azevedo, A., Boschi, C., Caixinhas, M. L., Carmona, M. J., Carvalho, M. I. B., Casanova, I., Comprido, J. B., Domingues, A., Espirito Santo, M. D., Fabião, C., Ferreira, J. L., Fonseca, N. A., Fouto, M. J., Godinho, B., Júdice, N., Mafra, I., Meireles, J., Melo, R., Monteiro, A., Monteiro, A., Moreira, M. B., Pereira, J. V., Romariz, D. A., Sérgio, C., Serôdio, J., Silva, D. R. (1998). Nova Enciclopédia LaRousse. *Círculo de Leitores*, 12, pp. 3721 – 3722.
6. Badawi, A. F. (1996). Molecular and genetic events in schistosomiasis-associated human bladder cancer: role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Letters*, 105, pp. 123-138.
7. Balmain, A., Gray, J., Ponder, B. (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nature Publishing Group*, 33, pp. 238 – 244.
8. Bassi, P. F. (2002). BCG (Bacillus of Calmette Guerin) therapy of high-risk superficial bladder cancer. *Surgical Oncology*, 11, pp. 77 – 83.
9. Beard, C. M., Lynn, C., Hartmann, Atkinson, E. J., O'Brien, P. C., Malkasian, G. D., Keeney, G. L., Melton, L. J. (2000). The Epidemiology of Ovarian Cancer: A Population-Based Study in Olmsted Country, Minnesota, 1935-1991. *Annals of Epidemiology*, 10, pp. 14 – 23.
10. Bektas, M., Rubenstein, D. S. (2011). The Role of Intracellular Protein – O – Glycosylation in Cell Adhesion and Disease. *Journal of Biomedical Research*, 25, pp. 227 – 236.

11. Bian, C. F., Zhang, Y., Sun, H., Li, D. F., Wang, D. C. (2011). Structural Basis for Distinct Binding Properties of the Human Galectins to Thomsen-Friedenreich Antigen. *PloS ONE*, 6, pp. 1 – 10.
12. Bostrom, P. J., Rhijn, B. W. G., Fleshner, N., Finelli, A., Jewett, M., Thoms, J., Hanna, S., Kuk, C., Zlotta, A. R. (2010). Staging and Staging Errors in Bladder Cancer. *European Urology Supplements*, 9, pp. 2 – 9.
13. Brandau, S., Suttman, H. (2007). Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: A success story with room for improvement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61, pp. 299 – 305.
14. Brocke, C., Kunz, H. (2002). Synthesis of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10, pp. 3085 – 3112.
15. Buskas, T., Thompson, P., Boons, G. J. (2009). Immunotherapy for Cancer: Synthetic Carbohydrate-based Vaccines. *Chemical Communications*, 36, pp. 5335 – 5349.
16. Campbell, B. J., Yu, L. G., Rhodes, J. M. (2003). Altered Glycosylation in inflammatory bowel disease: A possible role in cancer development. *Glycoconjugate Journal*, 18, pp. 851 – 858.
17. Campbell, C. T., Yarema, K. J. (2005). Large-scale approaches for glycobiology. *Genome Biology*, 6, pp. 1 – 8.
18. Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G. F., Karsten, U. (1996). Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult tissues: a systematic and comparative study. *Histochemistry and Cell Biology*, 106, pp. 197 – 207.
19. Carvalho, A. S., Harduin-Lepers, A., Magalhães, A., Machado, E., Mendes, N., Costa, L. T., Matthiesen, R., Almeida, R., Costa, J., Reis, C. A. (2010). Differential expression of  $\alpha$ -2,3-sialyltransferases and  $\alpha$ -1,3/4-fucosyltransferases regulates the levels of sialyl Lewis a and sialyl Lewis x in gastrointestinal carcinoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42, pp. 80–89.
20. Cattaruzza, M. S., Maisonneuve, P., Boyle, P. (1996). Epidemiology of Laryngeal Cancer. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*, 32B, pp. 293 – 305.
21. Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Rechi, M. A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., Delanoy, P. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research*, 345, pp. 1377 – 1383.

22. Cedeno-Laurent, F., Dimitroff, C. J. (2012). Galectin-1 research in T cell immunity: Past, present and future. *Clinical Immunology*, 142, pp. 107 – 116.
23. Chiariotti, L., Salvatore, P., Benvenuto, G., Bruni, C. B. (1999). Control of galectin gene expression. *Biochimie*, 81, pp. 381 – 388.
24. Cindolo, L., Benvenuto, G., Salvatore, P., Pero, R., Salvatore, G., Mirone, V., Prezioso, D., Altieri, V., Bruni, C. B., Chiariotti, L. (1999). Galectin-1 and Galectin-3 Expression in Human Bladder Transitional-Cell Carcinomas. *International Journal of Cancer*, 84, pp. 39 – 43.
25. Collste, L. G., Devinec, M., Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. K., Whitmore, W. F., Melamed, M. R. (1980). Bladder Cancer Diagnosis by Flow Citometry. *Cancer*, 45, pp. 2389 – 2394.
26. Colombel, M., Soloway, M., Akaza, H., Bohle, A., Palou, J., Buckley, R., Lamm, D., Brausi, M., Witjes, J. A., Persad, R. (2008). Epidemiology, Staging, Grading and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Association of Urology*, 7, pp. 618 – 626.
27. Constantini, C., Millard, F. (2011). Update on Chemotherapy in the Treatment of Urothelial Carcinoma. *The Scientific World Journal*, 11, pp. 1981 – 1994.
28. Dall'Ollio, F., Chiricolo, M. (2001). Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal*, 18, pp. 841 – 850.
29. Dam, T. K., Gabius, H. J., André, S., Kaltner, H., Lensch, M., Brewer, C. F. (2005). Galectins Bind to the Multivalent Glycoprotein Asiolofetuin with Enhanced Affinities and a Gradient of Decreasing Binding Constants. *Biochemistry*, 44, pp. 12564 – 12571.
30. Dandekar, N. P., Dalal, A. V., Tongaonkar, H. B., Kamat, M. R. (1997). Adenocarcinoma of Bladder. *European Journal of Surgical Oncology*, 23, pp. 157 – 160.
31. Dennis, J. W., Granovsky, M., Warren, C. E. (1999). Glycoprotein Glycosylation and Cancer Progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473, pp. 21 – 34.
32. Dippold, W., Steinborn, A., Buschenfelde, K. H. M. (1990). The Role of the Thomsen-Friedenreich Antigen As a Tumor-Associated Molecule. *Environmental Health Perspectives*, 88, pp. 255 – 257.
33. Disis, M. L. (2006). MUC1 Vaccines as Emerging Therapeutic Options for Cancer Patients. *Merck*, pp. 1 – 12.

34. Dobrowolski, Z. F., Dus, D., Halasra, J., Radzikowski, C. (1995). Prognostic value of an assessment of ABH(O) isoantigens and Thomsen-Friedenreich (TF) antigen expression in patients with urinary bladder tumors. *International Urology and Nephrology*, 27, pp. 395 – 404.
35. Dow, J. A., di Sant'Agnese, P. A., Cockett, A. T. (1989). Expression of blood group precursor T antigen as a prognostic marker for human bladder cancer treated by bacillus calmetteguerin and interleukin-2. *Journal of Urology*, 142, pp. 978 – 982.
36. Fletcher, A., Choudhury, A., Alam, N. (2011). Metastatic bladder cancer: A review of current management. *International Scholarly Research Network Urology*, 2011, pp. 1 – 8.
37. Gambert, U., Thiem, J. (1997). Chemoenzymatic synthesis of the Thomsen-Friedenreich antigen determinant. *Carbohydrate Research*, 299, pp. 85 – 89.
38. García-Closas, R., García-Closas, M., Kogevinasc, M., Malatsc, N., Silvermanb, D., Serrad, C., Tardoón, A., Carratof, A., Castaño-Vinyalsc, G., Dosemecib, M., Mooreb, L., Rothmanb, N., Sinhag, R. (2007). Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. *European Journal of Cancer*, 43, pp. 1732-1740.
39. Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113, pp. 236-247.
40. Gill, D. J., Chia, J., Senewiratne, J., Bard, F. (2010). Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *The Journal of Cell Biology*, 5, pp. 843 – 858.
41. Glinsky, V. V., Huflejt, M. E., Glinsky, G. V., Deutscher, S. L., Quinn, T. P. (2000). Effects of Thomsen-Friedenreich Antigen-specific Peptide P-30 on b-Galactosidemediated Homotypic Aggregation and Adhesion to the Endothelium of MDA-MB-435 Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 60, pp. 2584 – 2588.
42. Green, C (1989). The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 47, pp. 321 – 330.
43. Guey, L. T., García-Closas, M., Murta-Nascimento, C., Lloreta, J., Palencia, L., Kogevinas, M., Rothman, N., Vellalta, G., Calle, M. L., Marene, G., Tardón, A.,

- Carrato, A., García-Closas, R., Serra, C., Silverman, D. T., Chanock, S., Real, F. X., Malats, N. (2010). Genetic Susceptibility to Distinct Bladder Cancer Subphenotypes. *European Association of Urology*, 57, pp. 283 – 292.
44. Guo, Z., Wang, Q. (2009). Recent development in carbohydrate-based cancer vaccines. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13, pp. 608 -617.
45. Hakomori, S. I. (1996). Tumor Malignancy Defined by Aberrant Glycosylation and Sphingo(glyco)lipid Metabolism. *Cancer Research*, 56, pp. 5309 – 5318.
46. Hakomori, S. I. (2001). Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 491, pp. 369-402.
47. Hakomori, S. I. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, pp. 10231 – 10233.
48. Hakomori, S. I., Zhang, Y. (1997). Glycosphingolipid antigens and cancer therapy. *Chemistry & Biology*, 4, pp. 97 – 104.
49. Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S., Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83, pp. 727 – 737.
50. Heimburg-Molinaro, J., Lum, M., Vijay, G., Jain, M., Almogren, A., Rittenhouse-Olson, K. (2011). Cancer vaccines and carbohydrate epítopes. *Vaccine*, 29, pp. 8802 – 8826.
51. Hessels, D., Rittenhouse, H. G., Schalken, J. A. (2005). Molecular Diagnostics in Prostate Cancer. *EAU Update Series*, 3, pp. 200 – 213.
52. Humphrey, P. A. (2004). Urinary Bladder Pathology 2004: An Update. *Annals of Diagnostic Pathology*, 8, pp. 380 – 389.
53. Hussain, S. P., Harris, C. C. (1998). Molecular Epidemiology of Human Cancer. *Toxicology letters*, 102 – 103, pp. 219 – 225.
54. Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., Morozumi, K., Itzkowitz, S., Tsuda, T., Nishimura, S. I., Tsuji, S., Narimatsu, H. (1999). Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine- $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology*, 9, pp. 1213 – 1224.

55. Inoue, T., Obara, T., Saito, M., Kumazawa, T., Yuasa, T., Matuura, S., Tsuchiya, N., Satoh, S., Habuchi, T. (2007). Possible Survival Benefit of High-Dose-Intensity methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin Combination therapy (HD-MVAC) Over Conventional MVAC in Metastatic Urothelial Carcinoma Patients. *Acta Urology Japan*, 53, pp. 613 – 618.
56. Ismaili, N., Amazerin, M., Flechon, A. (2011). Chemotherapy in advanced bladder cancer: current status and future. *Journal of Hematology & Oncology*, 4, pp. 1 – 11.
57. Ito, K., Scott, S. A., Cutter, S., Dong, L. F., Neuzil, J., Blanchard, H., Ralph, S. J. (2011). Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*, 14, pp. 293 – 307.
58. Itzkowitz, S. H., Yuan, M., Montgomery, C. K., Kjeldsen, T., Takahashi, H. K., Bigbee, W. L., Kim, Y. S. (1989). Expression of Tn, Sialosyl-Tn, and T Antigens in Human Colon Cancer. *Cancer Research*, 49, pp. 197 – 204.
59. Itzkowitz, S. H., Bloom, E. J., Kokal, W. A., Modin, G., Hakomori, S. I., Kim, Y. S. (1990). A Novel Mucin Antigen Associated With Prognosis in Colorectal Cancer Patients. *Cancer*, 66, pp. 1960 – 1966.
60. Iurisci, I., Tinari, N., Natoli, C., Angelucci, D., Cianchetti, E., Iacobelli, S. (2000). Concentrations of Galectin-3 in the Sera of Normal Controls and Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 6, pp. 1389 – 1393.
61. Jiang, S. Y., Ma, Z., Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 10, pp. 1 – 24.
62. Ju, T., Lanneau, G. S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S. R., Willard, M. T., Wang, W., Xia, J. Y., Zuna, R. E., Laszik, Z., Benbrook, D. M., Hanigan, M. H., Cummings, R. D. (2008). Human Tumor Antigens Tn and Sialyl Tn Arise from Mutations in Cosmc. *Cancer Research*, 68, pp. 1636 – 1646.
63. Kartal, O., Mahlow, S., Skupin, A., Ebenhoh, O. (2011). Carbohydrate-active Enzymes Exemplify Entropic Principles in Metabolism. *Molecular Systems Biology*, 542, pp. 1-11.
64. Kawamura, S., Ohyama, C., Watanabe, R., Satoh, M., Saito, S., Hoshi, S., Gasa, S., Orikasa, S. (2001). Glycolipid Composition in Bladder Tumor: A Crucial Role of

- GM3 Ganglioside in Tumor Invasion. *International Journal of Cancer*, 94, pp. 343 – 347.
65. Kelly, J. R., Duggan, J. M. (2002). Gastric cancer epidemiology and risk factors. *Journal of Clinical Epidemiology*, 56, pp. 1 – 9.
66. Kim, E. H., Misek, D. E. (2011). Glycoproteomics – Based Identification of Cancer Biomarkers. *International Journal of Proteomics*, 2011, pp. 1 -10.
67. Kim, Y. S., Deng, G. (2008). Aberrant Expression of Carbohydrate Antigens in Cancer: The Role of Genetic and Epigenetic Regulation. *Gastroenterology*, 135, pp. 305 – 308.
68. Kim, Y. J., Varki, A. (1997). Perspectives on the significance of altered Glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate Journal*, 14, pp. 569 – 576.
69. Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeny, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W. M., Sesterhenn, I. A., Tachibana, M., Weider, J. (2005). Bladder Cancer: Epidemiology, Staging and Grading, and Diagnosis. *Urology*, 66, pp. 4 – 34.
70. Kitamura, H., Cho, M., Lee, B. H., Gum, J. R., Siddiki, B. B., Ho, S. B., Toribara, N. W., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., Kitamura, Y., Yonezawa, S., Kim, Y. S. (1996). Alteration in Mucin Gene Expression and Biological Properties of HT29 Colon Cancer Cell Subpopulations. *European journal of Cancer*, 32, pp. 1788 – 1796.
71. Knowles, M. A. (2005). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*, 27, pp. 361 – 373.
72. Konety, B. R. (2006). Molecular markers in bladder cancer: A critical appraisal. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 24, pp. 326 – 337.
73. Koskela, L. R., Poljakovic, M., Ehrén, I., Wiklund, N. P., Verdier, P. J. (2012). Localization and expression of inducible nitric oxide synthase in patients after BCG treatment for bladder cancer. *Nitric Oxide*, 27, pp. 185 – 191.
74. Kumamoto, K., Goto, Y., Sekikawa, K., Takenoshita, S., Ishida, N., Kawakita, M., Kannagi, R. (2001). Increased Expression of UDP-Galactose Transporter Messenger RNA in Human Colon Cancer Tissues and Its Implication in Synthesis of Thomsen-Friedenreich Antigen and Sialyl Lewis A/X Determinants. *Cancer Research*, 61, pp. 4620 – 4627.

75. Landman, J; Droller M. (1998). Risk factors in clonal development from superficial to invasive bladder cancer. *Cancer Surveys*, 31, pp. 5 – 15.
76. 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. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, 172, pp. 45 – 49.
77. Langkilde, N. C., Wolf, H., Clausen, H., Ortoft, T. F. (1992). Human urinary bladder carcinoma glycoconjugates expressing T- 1 gal beta (1-3)GalNAc alpha 1 – O – R) and T-like antigens: A comparative study using peanut agglutinin and poly- and monoclonal antibodies. *Cancer Research*, 52, pp. 5030 – 5036.
78. Le Mercier, M., fortin, S., Mathieu, V., Kiss, R., Lefranc, F. (2010). Galectins and Gliomas. *Brain Pathology*, 20, pp. 17 – 27.
79. Li, H., Anjou, M. (2009). Pharmacological Significance of Glycosylation in Therapeutic Proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, pp. 678 – 684.
80. Li, J., Richards, J. C. (2010). Functional Glycomics and Glycobiology: An Overview. *Methods in Molecular Biology*, 600, pp. 1 – 8.
81. Li, M., Song, L., Qin, X. (2010). Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. *Journal of Biosciences*, 35, pp. 665 – 673.
82. Lima, L., Dinis-Ribeiro, M., Longatto-Filho, A., Santos, L. (2012). Predictive Biomarkers of Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy Response in Bladder Cancer: Where Are We Now?. *Advances in Urology*, 2012, pp. 1 – 17.
83. Maeda, T., Takahashi, A., Hirobe, M., Honma, I., Masumori, N., Itoh, N., Tsukamoto, T. (2007). Adverse Events of MVAC Chemotherapy in Patients With Advanced Urothelial Cancer of the Bladder. *Acta Urology Japan*, 53, pp. 213 – 219.
84. Maia, I. G., Leite, A. (2001). N – glycosylation in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*, 24, pp. 231 – 234.
85. Martensson, S., Bigler, S. A., Brown, M., Lange, P. H., Brawer, M. K., Hakomori, S. I. (1995). Sialyl-Lewis<sup>x</sup> and Related Carbohydrate Antigens in the Prostate. *Human Pathology*, 26, pp. 735 – 739.
86. Matthew, J. A., Fellows, I. W., Prior, A., Kennedy, H. J., Robin, R., Johnson, I. T. (1997). Habitual intake of fruits and vegetables amongst patients at increased risk of colorectal neoplasia. *Cancer Letters*, 114, pp. 255 – 258.

87. Meany, D. L., Chan, D. W. (2011). Aberrant Glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clinical Proteomics*, 8, pp. 1 – 14.
88. MedlinePlus. [Em linha]. Disponível em <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000486.htm>>. [Consultado em 20/01/2012].
89. Meijden, A., Sylvester, R. J. (2003). BCG Immunotherapy for Superficial Bladder Cancer: An Overview of the Past, the Present and the Future. *EAU Update Series*, 1, pp. 80 – 86.
90. Miles, D. W., Happerfield, L. C., Smith, P., Gillibrand, R., Bobrow, L. G., Gregory, W. M., Rubens, R. D. (1994). Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *British Journal Cancer*, 70, pp. 1272 – 1275.
91. Milosevic, M., Gospodarowicz, M., Zietman, A., Abbas, F., Haustermans, K., Moonen, L., Rodel, C., Schoenberg, M., Shipley, W. (2007). Radiotherapy for Bladder Cancer. *Journal of Urology*, 69, pp. 80 – 92.
92. Mody, R., Joshi, S., Chancy, W. (1995). Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33, pp. 1 – 10.
93. Moore, L. E., Wiencke, J. K., Bates, M. N., Zheng, S., Rey, O. A., Smith, A. H. (2004). Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case – control study in Argentina. *Cancer Letters*, 211, pp. 199 – 207.
94. Mukhopadhyay, P., Chakraborty, S., Ponnusamy, M. P., Lakshmanan, I., Jain, M., Batra, S. K. (2011). Mucins in the pathogenesis of breast cancer: Implications in diagnosis, prognosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1815, pp. 224 – 240.
95. Muroi, K., Handa, K., Amemiya, Y., Hakomori, S. I., Ozawa, K., Miura, Y. (1998). Expression profiles of I and sialosyl-I antigens on blood cells: the sialosyl-I antigen is expressed along the monocytic differentiation. *Leukemia Research*, 22, pp. 1029–1036.
96. Nangia-Makker, P., Conklin, J., Hogan, V., Raz, A. (2002). Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine*, 8, pp. 187 – 192.

97. Narayanan, S. (1994). Sialic acid as a tumor marker. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 24, pp. 376 – 384.
98. National Cancer Institute. [Em linha]. Disponível em <<http://cancer.gov/>>. [Consultado em 24/01/2012].
99. Neu, U., Bauer, J., Stehle, T. (2011). Viruses and sialic acids: rules of engagement. *Current Opinion in Structural Biology*, 21, pp. 610 – 618.
100. Nieuwenhuijzen, J. A., Pos, F., Moonen, L. M. F., Hart, A. A. M., Horenblas, S. (2005). Survival after Bladder-Preservation with Brachytherapy versus Radical Cystectomy; A Single Institution Experience. *European Urology*, 48, pp. 239 – 245.
101. Numahata, K., Satoh, M., Handa, K., Salto, S., Ohyama, C., Ito, A., Takahashi, T., Hoshi, S., Orikasa, S., Hokomori, S. I. (2002). Sialosyl-Lex Expression Defines Invasive and Metastatic Properties of Bladder Carcinoma. *American Cancer Society*, 94, pp. 673 – 685.
102. Ogana, J. I., Inoue, H., Koide, S. (1995). Prognostic Significance of Lewis x Related Antigen Expression in Stage I Non-small Cell Lung Cancer. *European Journal of Cancer*, 10, pp. 1716.
103. Ono, M., Hakomori, S. I. (2004). Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconjugate Journal*, 20, pp. 71 – 78.
104. Oosterlinck, W., Lobel, B., Jakse, G., Malmstrom, P. U., Stockle, M., Sternberg, C. (2002). Guidelines on Bladder Cancer. *European Urology*, 41, pp. 105 – 112.
105. Palmeira, C., Ribeiro, N., Ribeiro, E., Godinho, I., Sousa, M. E., Caetano, C., Lima, E., Martins, G. (2007). Avaliação do Conteúdo de DNA por Citometria de Fluxo em Linfomas Não Hodgkin de Células B: Situação Actual e Perspectivas Futuras. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 4, pp. 88 – 93.
106. Patterson, M. C. (2005). Metabolic Mimics: The Disorders of N – linked Glycosylation. *Seminars in Pediatric Neurology*, 12, pp. 144 – 151.
107. Pinho, S., Marcos, N. T., Ferreira, B., Carvalho, A. S., Oliveira, M. J., Santos-Silva, F., Harduin-Lepers, A., Reis, C. A. (2007). Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: Modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Letters*, 249, pp. 157 – 170.
108. Plattner, V. E., Wagner, M., Ratzinger, G., Gabor, F., Wirth, M. (2008). Targeted drug delivery: Binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer

- cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, pp. 572 – 576.
109. Qiu, D., Gandhi, S. S., Koganty, R. R. (1996). [3Gal(1-3)GalNAc Block Donor for the Synthesis of TF and a Sialyl(2-6)TF as Glycopeptide Building Blocks. *Tetrahedron Letters*, 37, pp. 595 – 598.
110. Rabinovich, G. A. (2005). Galectin-1 as a potential cancer target. *British Journal of Cancer*, 92, pp. 1188 – 1192.
111. Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Jackson, S. S., Vasta, G. R. (2007). Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology*, 17, pp. 513 – 520.
112. Raghavan, D. (2000). Advanced bladder and urothelial cancers. *European Journal of Cancer*, 36, pp. S1 – S6.
113. Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C. H., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J. P., Poggio, T., Gerald, W., Loda, M., Lander, E. S., Golub, T. R. (2001). Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Medical Sciences*, 98, pp. 15149 – 15154.
114. Ramsland, P. A., Farrugia, W., Bradford, T. M., Hogarth, P. M., Scott, A. M. (2004). Structural Convergence of Antibody Binding of Carbohydrate Determinants in Lewis Y Tumor Antigens. *Journal of Molecular Biology*, 340, pp. 809 – 818.
115. Ravindranath, M. H., Amiri, A. A., Bauer, P. M., Kelley, M. C., Essner, R., Morton, D. L. (1997). Endothelial-Selectin Ligands Sialyl Lewis<sup>x</sup> and Sialyl Lewis<sup>a</sup> Are Differentiation Antigens Immunogenic in Human Melanoma. *American Cancer Society*, 79, pp. 1686 – 1697.
116. Ristow, C. M., Yamamoto, C. T., Fávoro, M. (2006). Factores de risco e patogênese das neoplasias malignas epiteliais de ovário: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 52, pp. 185 – 195.
117. RORENO. [Em linha]. Disponível em <[http:// www.roreno.com.pt](http://www.roreno.com.pt)>. [Consultado em 03/02/2012].
118. Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., Rabinovich, G. A. (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*, 5, pp. 241 – 251.

- 119.Schen, Y., Kohla, G., Lrhorfi, A. L., Sipos, B., Kalthoff, H., Gerwig, G. J., Kamerling, J. P., Schauer, R., Tiralongo, J. (2004). O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids in human colorectal carcinoma. *European Journal of Biochemistry*, 271, pp. 281 – 290.
- 120.Schietinger, A., Philip, M., Schreiber, H. (2008). Specificity in cancer immunotherapy. *Seminars in Immunology*, 20, pp. 276 – 285.
- 121.Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (2003). Anatomia e Fisiologia. *Lusociência*, pp. 967 – 968.
- 122.Shah, S. C., Kusiak, A., O'Donnell, M. A. (2006). Patient-recognition data-mining model for BCG-plus interferon immunotherapy bladder cancer treatment. *Computers in Biology and Medicine*, 36, pp. 634 – 655.
- 123.Sharon, N., Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14, pp. 53R – 62R.
- 124.Silk, A. W., Schoen, R. E., Potter, D. M., Finn, O. J. (2009). Humoral immune response to abnormal MUC1 in subjects with colorectal adenoma and cancer. *Molecular Immunology*, 47, pp. 52 – 56.
- 125.Simon, M. A., Lokeshwar, V. B., Soloway, M. S. (2002). Current bladder cancer tests: unnecessary or beneficial? *Oncology/Hematology*, 47, pp. 91 – 107.
- 126.Springer, G. F. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine*, 75, pp. 594 – 602.
- 127.Sakaki, M., Oka, N., Nakanishi, R., Yamaguchi, K., Fukumori, T., Kanayama, H. (2008). Serum level of galectin-3 in human bladder cancer. *The Journal of Medical Investigation*, 55, pp. 127 – 132.
- 128.Skinner, D. G. (1977). Current State of Classification and Staging of bladder Cancer. *Cancer Research*, 37, pp. 2838 – 2842.
- 129.Smith, S. D., Wheeler, M. A., Plescia, J., Colberg, J. W., Weiss, R. M., Altieri, D. C. (2001). Urine Detection of Survivin and Diagnosis of Bladder Cancer. *Journal of the American Medical Association*, 285, pp. 324 – 328.
- 130.Springer, G. F. (1997). Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *Journal of Molecular Medicine*, 75, pp. 594 – 602.
- 131.Springer, G. F., Desai, P. R., Spencer, B. D., Teqtmeyer, H., Carlstedt, S. C., Scanlon, E. F. (1995). T/Tn antigen vaccine is effective and safe in preventing

- recurrence of advanced breast carcinoma. *Cancer Detection and Prevention Journal*, 19, pp. 374 – 380.
132. Stadler, W. M., Kuzel, T. M., Raghavan, D., Levine, E., Vogelzang, N. J., Roth, B., Dorr, F. A. (1997). Metastatic Bladder Cancer: Advances in Treatment. *European Journal of Cancer*, 33, pp. S23 – S26.
133. Stain, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., Skinner, E., Bochner, B., Thangathurai, D., Mikhail, M., Raghavan, D., Skinner, D. G. (2001). Radical Cystectomy in the Treatment of Invasive Bladder Cancer: Long-Term Results in 1.054 Patients. *Journal of Clinical Oncology*, 19, pp. 666 – 675.
134. Tarp, M. A., Clausen, H. (2008). Mucin – type O – Glycosylation and its Potential Use in Drug and Vaccine Development. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780, pp. 546 – 563.
135. Urgoski, M., Laskowska, A. (2002). Sialyl Lewis<sup>a</sup>: a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochimica Polonica*, 49, pp. 303 – 311.
136. Varki, A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 446, pp. 1023 – 1029.
137. Varki, N. M., Varki, A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation*, 87, pp. 851 – 857.
138. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., Etzler, M. E. (2009). Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2<sup>a</sup> edição.
139. Wang, P. H. (2004). Altered Sialylation and Sialyltransferase Expression in Gynecologic Cancers. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 43, pp. 53 – 63.
140. Whalen, L. J., McEvoy, K. A., Halcomb, R. L. (2003). Synthesis and evaluation of phosphoramidate amino acid-based inhibitors of sialyltransferases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, pp. 301 – 304.
141. Wild, C. P., Law, G. R., Roman, E. (2001). Molecular epidemiology and cancer: promising areas for future research in the post-genomic era. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 499, pp. 3 – 12.
142. Wong C. H. (1999). Mimics of Complex Carbohydrates Recognized by Receptors. *Accounts of Chemical Research*, 32, pp. 376 – 385.

143. Xu, Y., Sette, A., Sidney, J., Gendler, A. J., Franco, A. (2005). Tumor-associated carbohydrate antigens: A possible avenue for cancer prevention. *Immunology and Cell Biology*, 83, pp. 440 – 448.
144. Yamaoka, K., Mishima, K., Nagashima, Y., Asai, A., Sanai, Y., Kirino, T. (2000). Expression of galectin-1 mRNA correlates with the malignant potential of human gliomas and expression of antisense galectin-1 inhibits the growth of 9 glioma cells. *Journal of Neuroscience Research*, 59, pp. 722 – 730.
145. Yossepowitch, O., Dalbagni, G. (2002). Transitional Cell Carcinoma of the Bladder in Young Adults: Presentation, Natural History and Outcome. *The Journal of Urology*, 168, pp. 61 – 66.
146. Yafi, F. A., North, S., Kassouf, W. (2011). First-and second-line therapy for metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Current Oncology*, 18, pp. e25 – e34.
147. Young, R. H., Eble, J. N. (1991). Unusual Forms of Carcinoma of the Urinary Bladder. *Human Pathology*, 22, pp. 948 – 965.
148. Yu, C. J., Shih, J. Y., Lee, Y. C., Shun, C. T., Yuan, A., Yang, P. C. (2004). Sialyl Lewis antigens: association with MUC5AC protein and correlation with post-operative recurrence of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 47, pp. 59 – 67.
149. Yuriev, E., Farruga, W., Scott, A. M., Ramsland, P. A. (2005). Three-dimensional structures of carbohydrate determinants of Lewis system antigens: Implications for effective antibody targeting of cancer. *Immunology and Cell Biology*, 83, pp. 709 – 717.
150. Zhang, S., Zhang, H. S., Cordon-Cardo, C., Reuter, V. E., Singhal, A. K., Lloyd, K. O., Livingston, P. O. (1997). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *International Journal of Cancer*, 73, pp. 50 – 56.
151. Zhu, J., Wan, Q., Danishefsky, S. J. (2009). Synthesis of biotinylated tumor-associated carbohydrate antigens for immunological studies. *Tetrahedron Letters*, 50, pp. 712 – 714.
152. Kovarik, J., Siegrist, C. A. (1998). Immunity in early life. *Immunology Today*, 19, pp. 150 – 152.