

Sofia do Rosário Alves Pereira

**Alterações Numéricas dos Cromossomas 7, 8, 9 e 17,
e dos Genes TP53 e c-*erb*B2 nos Carcinomas
Uroteliais da Bexiga**



**Mestrado em Oncologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar
Universidade do Porto
1999/2001**



UNIVERSIDADE DO PORTO



**Jefferson
Medical
College**

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO
DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
DA UNIVERSIDADE DO PORTO

**Alterações Numéricas dos Cromossomas 7, 8, 9 e 17,
e dos Genes TP53 e *c-erbB2*
nos Carcinomas Uroteliais da Bexiga**

Sofia do Rosário Alves Pereira

Porto, 2001

RESUMO

Neste estudo foram avaliadas as alterações numéricas dos cromossomas 7, 8, 9 e 17, e dos genes TP53 e *c-erbB2*, por hibridização *in situ* de fluorescência, numa amostra de carcinomas uroteliais de bexiga. Foi estudada também a expressão das proteínas p53, *c-erbB2* e Ki-67.

Verificou-se que a que a monossomia dos cromossomas 9 e 17, e a trissomia do cromossoma 7, eram alterações frequentes nos tumores limitados à mucosa. Os tumores com deleção de um locus do gene TP53 apresentavam acumulação nuclear da proteína, o que sugere uma associação entre estes dois eventos que poderão ser a razão da perda de função deste gene supressor. A invasão da parede da bexiga pelo tumor foi acompanhada pelo aumento do número de cópias dos cromossomas estudados, e pela amplificação do gene *c-erbB2* em cerca de 25% dos casos. Os tumores com amplificação deste gene nem sempre apresentaram sobreexpressão da proteína. A aneuploidia observada foi acompanhada de um aumento do índice proliferativo.

Estas características biopatológicas podem ser importantes no prognóstico e na estratificação de doentes para terapêuticas específicas.

SUMMARY

In this study the numeric alterations in chromosomes 7, 8, 9 and 17, and TP53 and *c-erbB2* genes were evaluated by fluorescence *in situ* hybridisation in urothelial cell carcinomas of the bladder. Expression of p53, *c-erbB2* and Ki-67 proteins was also studied.

Monosomy of chromosomes 9 and 17, as well as trisomy of chromosome 7, were frequent abnormalities in the tumours confined to the mucosa. Tumours with TP53 deletions had also p53 nuclear accumulation, which suggests that these two events are associated and might be the reason for the loss of this tumour suppressor gene function. Tumoral invasion was accompanied by an increase number of copies of all chromosomes studied, and by *c-erbB2* gene amplification in about 25% of the cases. Those tumours with *c-erbB2* gene amplification, did not always present overexpression of *c-erbB2* protein. Aneuploidy was accompanied by the increasement of the proliferative index.

These biopathological characteristics can be important in determine prognosis and stratify patients according to specific therapies.

RESUMEN

Se realizó un estudio de hibridación in situ por fluorescencia sobre las alteraciones numéricas de los cromosomas 7, 8, 9 y 17, y de los genes TP53 y *c-erbB2*, en una serie de casos con carcinoma urotelial de vejiga. Al mismo tiempo se estudio la expresión de las proteínas p53, *c-erbB2* y Ki-67.

Se verifico que la monosomía de los cromosomas 9 y 17, junto a la trisomía del cromosoma 7 son alteraciones frecuentes en los tumores limitados a la mucosa. Aquellos tumores con dilección de un locus del gen TP53 presentaban acumulación nuclear de la proteína p53, lo que podría sugerir una asociación entre estos dos eventos y podría justificar la perdida de la función de este gen supresor.

La invasión de la pared vesical por el tumor se acompañó de un aumento del número de copias de los cromosomas estudiados y en un 25% de los casos existía una amplificación del gen *c-erbB2*. Los tumores con esta amplificación no siempre presentaron sobreexpresión de la proteína *c-erbB2*. La aneuploidia se ha acompañado de un elevado índice proliferativo.

Estas características biopatológicas pueden tener importancia en el pronóstico y en la estratificación de estos pacientes para la realización de tratamientos específicos.

ÍNDICE

1- INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1- Aspectos epidemiológicos	1
1.2- Carcinoma urotelial e sua evolução clínica	2
1.3- Objectivos	3
1.4- Referências Bibliográficas	4
2- ALTERAÇÕES NUMÉRICAS DOS CROMOSSOMAS 7, 8, 9 E 17 NOS CARCINOMAS UROTELIAIS INVASORES E SUPERFICIAIS PAPILARES	6
2.1- Introdução	6
2.2- Material e métodos	8
2.3- Resultados	10
2.4- Discussão	15
2.5- Conclusões	18
2.6- Referências Bibliográficas	19
3- ALTERAÇÕES DOS GENES TP53 E C- <i>ERBB2</i> E PROTEÍNAS ASSOCIADAS, E ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS CARCINOMAS UROTELIAIS INVASORES E SUPERFICIAIS PAPILARES	25
3.1- Introdução	25
3.2- Material e métodos	29
3.3- Resultados	31
3.4- Discussão	38
3.5- Conclusões	41
3.6- Referências Bibliográficas	42
4- CONCLUSÕES GLOBAIS	48
5- ESTUDOS FUTUROS	49
6- AGRADECIMENTOS	50

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1-ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O carcinoma da bexiga é considerado a sexta neoplasia mais comum no mundo, afectando aproximadamente três vezes mais homens do que mulheres [1]. No Reino Unido são estimados para este tumor e por ano, 12 900 novos casos e 5 400 mortes [2]. Nos Estados Unidos, em 1997, estimou-se que ocorreriam 54 000 novos casos e 12 000 mortes por cancro da bexiga [3]. Em Portugal este cancro é um dos mais frequentes. No Registo Oncológico Nacional referente ao ano de 1993, a taxa de incidência para o cancro da bexiga foi de 17,9 e 4,6 por 100 000 habitantes no sexo masculino e feminino, respectivamente. A taxa de incidência deste tumor maligno tem um aumento significativo a partir da quinta década de vida, sendo o carcinoma urotelial o tipo histológico mais frequente (86,2%) [4].

Há evidências que associam o carcinoma da bexiga a distintos factores etiológicos, entre os quais exposição ocupacional a anilinas, aminas aromáticas e compostos cíclicos. Agentes virais, bacterianos e parasitários, bem como cistolitíase, terapêutica com ciclofosfamida e irradiação pélvica, são também apontados como factores etiológicos potenciais [5]. O consumo de tabaco é considerado o agente ambiental mais associado ao carcinoma da bexiga [6-9]. Estes agentes comportam-se como factores carcinogénicos, e o seu mecanismo de acção envolve a indução de alterações no DNA, perturbação nos mediadores da sua reparação, a indução da cascata da apoptose e a alteração nos mecanismos de controlo da replicação celular [7]. Assim, no carcinoma da bexiga, os eventos envolvidos no processo carcinogénico poderão ser de índole genética e/ou epigenética, os quais promovem a perda de função de genes críticos, seja por mutação, metilação ou perda de heterozigotia [10]. Deste modo, o estudo das alterações genéticas e do seu significado biopatológico poderá elucidar os passos fundamentais da transformação maligna urotelial e a identificação de factores de prognóstico ou de resposta à terapêutica.

1.2- CARCINOMA UROTELIAL E SUA EVOLUÇÃO CLÍNICA

O carcinoma da bexiga engloba diferentes entidades histopatológicas, sendo a sua maioria carcinomas uroteliais [4]. Setenta por cento destes são superficiais (30% apresentam-se multifocais). Cerca 60 a 70% destes tumores irão recorrer e 10 a 20% sofrerão progressão. O grupo dos tumores que apresentam invasão muscular aquando do diagnóstico contribui com a maior parte das mortes por cancro de bexiga [12].

Nos tumores superficiais, o risco real da doença recorrer e/ou progredir, aquando do diagnóstico e após terapêutica, cirúrgica mantém-se. As características clinicopatológicas destes tumores, fundamentalmente nos mais precoces, não têm a capacidade de discriminar os doentes nos quais este risco é mais elevado. Por este motivo, têm sido investigados aspectos da biologia tumoral com a intenção de melhorar a estratificação de grupos de risco [7, 13].

Nos carcinomas invasores o grau e o estágio são os factores de prognóstico mais importantes. No entanto, em relação à resposta à terapêutica adjuvante e ao seu impacto na sobrevivência global, nem sempre estas variáveis permitem a estratificação dos doentes [7]. Há, assim, necessidade de associar outros factores que aumentem a sua sensibilidade e especificidade.

Este é o sentido da presente tese, na qual se foi estudar as alterações numéricas dos cromossomas mais frequentemente envolvidos no carcinoma urotelial (cromossomas 9 e 17), bem como do cromossoma 7, associado à proliferação, e do cromossoma 8, cujas alterações se associam à agressividade do tumor da bexiga. Também foram estudados os genes TP53 e *c-erbB2*, o primeiro considerado como o guardião do genoma, e o segundo cuja amplificação condiciona o prognóstico em outras neoplasias.

1.3- OBJECTIVOS

O objectivo geral deste estudo foi:

- Determinar as alterações fundamentais nos marcadores biológicos estudados, em função da progressão do tumor urotelial determinada pelo seu grau de invasão e perda de diferenciação.

Os objectivos específicos foram:

- 1- Determinar as alterações numéricas dos cromossomas 7, 8, 9 e 17, e dos genes TP53 e *c-erbB2*, nos tumores superficiais papilares e invasores, e comparar estes dois grupos.
- 2- Relacionar as alterações numéricas dos cromossomas 7, 8, 9 e 17, e genes TP53 e *c-erbB2*, com as variáveis clinicopatológicas.
- 3- Avaliar a expressão do produto dos genes estudados (proteínas p53 e *c-erbB2*) e do marcador de proliferação Ki-67 nos carcinomas superficiais papilares e invasores, e verificar a sua correlação com as variáveis clinicopatológicas.
- 4- Relacionar as alterações encontradas nos genes TP53 e *c-erbB2* com a expressão das respectivas proteínas (p53 e *c-erbB2*), e com o índice proliferativo.
- 5- Avaliar a potencial utilidade terapêutica das variáveis estudadas.

1.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Landman J., Droller M. Risk factors in clonal development from superficial to invasive bladder cancer. *Cancer Surveys - Bladder Cancer*. 31: 5-15. 1998.
- 2- Black R., Bray F., Ferlay J., et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eup J Cancer*. 33: 1075-1107. 1997.
- 3- Parker S., Tong T., Balder S., Wingo P. Cancer statistics 1997. *CA A Cancer Journal For Physicians*. 47: 5-27. 1997.
- 4- Registo Oncológico Nacional. Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil. 1993.
- 5- Rosell R., Abad A., Monzo M., Molina F. *Oncologia Médica*. Ediciones Ergon. Madrid. pp 5-7. 1995.
- 6- Isaacson, McGee, Wright. *Oxford Textbook of Pathology*. Vol. 1. Oxford University Press. New York. pp 688. 1992.
- 7- Lee R., Droller M. The natural history of bladder cancer – Implications for therapy. *Urol Clin North Am*. 27: 1-4. 2000.
- 8- Vogelstein B., Kinzler K, eds. *The Genetic Basis of Human Cancer*. McGraw Hill. New York. pp 639. 1998.
- 9- Silverman D., Rothman N., Devesa S. Epidemiology of bladder cancer. *Bladder Cancer – Biology Diagnosis, and Management*. Oxford University Press. 11-55. 1999.
- 10- Knowles M. Molecular Genetics of bladder cancer: Pathways of development and progression. *Cancer Surveys – Bladder Cancer*. 31: 49-75. 1998.

- 12- DeNeal. Pathological aspects of T1 G3 urothelial carcinoma and carcinoma *in situ*. In: Böhle A, Jocham D, eds. *Optimal therapy for patients with high-risk superficial bladder cancer – controversy and consensus*. (MEDICINE Publishing Foundation Symposium Series 37) Oxford: The Medicine Group (Education) Ltd. pp 2. 1997.
- 13- Zlotta A., Schulman C. Biological markers in superficial bladder tumors and their prognostic significance. *Urol Clin North Am*. 27: 179-189. 2000.

2- ALTERAÇÕES NUMÉRICAS DOS CROMOSSOMAS 7, 8, 9 E 17 NOS CARCINOMAS UROTELIAIS SUPERFICIAIS PAPILARES E INVASORES

2.1.- INTRODUÇÃO

Diversos estudos utilizando técnicas de citogenética convencional e de perda de heterozigotia têm revelado uma série de anomalias cromossômicas frequentes e não aleatórias, indiciando que existem regiões cromossômicas usualmente envolvidas na carcinogénese dos tumores uroteliais [1-4]. As alterações observadas incluem a monossomia ou deleções parciais do cromossoma 9, perda do cromossoma 17 e ganho do cromossoma 7. Ganhos do cromossoma 8 e alterações intersticiais dos cromossomas 1, 3p, 11p e 13 foram também documentados [5-7].

Tem sido observado um padrão de alterações cromossômicas associado à morfologia (e agressividade) dos carcinomas superficiais. Assim, deleções parciais do cromossoma 9 ocorrem com frequência nos carcinomas superficiais papilares e de baixo grau, enquanto que as alterações predominantes dos carcinomas superficiais *in situ* se localizam usualmente nos cromossomas 8, 14 e 17. Quando ocorre progressão da doença todos os cromossomas referidos, nomeadamente o 7, 8, 9 e 17 estão alterados [8-10].

Cromossoma 7

O número de cópias do cromossoma 7 correlaciona-se, em muitos modelos neoplásicos, com o grau de diferenciação e com o aumento da proliferação celular [5]. A trissomia deste cromossoma está frequentemente associada a um comportamento biológico mais agressivo no carcinoma da bexiga [11, 12].

Cromossoma 8

Alterações no cromossoma 8 têm sido detectadas no carcinoma da bexiga e, geralmente, resultam na perda de material do braço curto [13, 14] e ganho do braço longo [15]. Em ambos os casos, estas alterações estão associadas a tumores uroteliais com maior agressividade [16].

Cromossoma 9

Perdas de regiões do cromossoma 9 (tanto do braço curto, como do braço longo) estão envolvidas em, aproximadamente, 60% dos carcinomas uroteliais, independentemente do grau e do estágio [1, 17], pelo que se crê que este seja um evento precoce na carcinogénese da bexiga [18]. No braço curto, estão localizados genes críticos no controlo do ciclo celular, nomeadamente os que codificam as proteínas p15 (*CDKN2B*), p16 e p14^{ARF} (*CDKN2A*) [19]. No braço longo deste cromossoma estão localizadas três regiões usualmente perdidas no carcinoma da bexiga (DBC1, TCC1 e TCC2); por esse motivo se supõe que correspondam à localização de genes supressores do carcinoma da bexiga [20]. Delecções concomitantes de segmentos do braço curto e longo, e perda completa do cromossoma 9, são frequentes [21, 22].

Cromossoma 17

No cromossoma 17 localizam-se dois dos genes associados à transformação maligna e progressão neoplásica – o gene TP53 localizado no braço curto e o gene *c-erbB2* localizado no braço longo. Tanto a perda de heterozigotia (LOH) do 17p [8], como a polissomia [23] foram associadas à progressão do carcinoma da bexiga.

A progressão tumoral, definida pela dimensão da invasão da parede do órgão e perda de diferenciação, acompanha-se de aneuploidia manifestada a nível cromossómico. Assim, torna-se necessário verificar quais são as alterações genéticas não aleatórias que se associam aos parâmetros histopatológicos, classicamente relacionados com o prognóstico e que, eventualmente, venham a revelar-se úteis na identificação de grupos com um risco distinto de progressão ou de resposta à terapêutica (intravesical ou sistémica). Neste contexto, e mediante a utilização de sondas centroméricas e técnicas de citogenética molecular, estudaram-se as alterações dos cromosomas 7, 8, 9 e 17 em carcinomas uroteliais superficiais papilares e invasores da bexiga.

2.2- MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados carcinomas uroteliais da bexiga de 68 doentes (18 do sexo feminino e 50 do sexo masculino). Destes, 45 foram classificados como carcinomas papilares superficiais e 23 como carcinomas invasores (3 de morfologia papilar e 20 de morfologia não papilar). A idade mediana, à data do diagnóstico, foi de 64 anos (mínimo 23 e máximo 83 anos). Os doentes foram admitidos e tratados consecutivamente, entre os anos de 1990 e 1998, no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Centro Regional do Norte. O seguimento mediano foi de 50 meses (mínimo 4 e máximo 126 meses). O tratamento cirúrgico primário com intenção curativa foi a ressecção trans-uretral (RTU) em 58 doentes (85,4%), a cistectomia parcial em 3 doentes (4,4%) (tendo um doente sido submetido a quimioterapia neoadjuvante) e a cistectomia radical em 4 doentes (5,8%) (dois dos quais realizaram quimioterapia neoadjuvante). Três doentes (4,4%) após a realização da biópsia para o diagnóstico inicial não fizeram qualquer tipo de tratamento no IPO–Porto. As amostras estudadas foram obtidas previamente a qualquer tratamento citotóxico intravesical ou sistémico. As neoplasias foram classificadas histologicamente de acordo com os critérios propostos pela OMS [24]. A classificação por graus e estádios foi realizada segundo a classificação proposta em 1997 pelo AJCC [25] (Tabela 2.3.1).

2.2.1 - Técnica de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH)

Todas as amostras de tecido utilizadas tinham sido fixadas em formol tamponado a 10% e incluídas em parafina. Para o presente trabalho foram feitos cortes de 4 µm montados em lâminas de vidro revestidas com 3-aminopropiltrioxi-silano (C₉H₂₃NO₃Si) (Sigma Chemical Co.).

Para o estudo de FISH foram usadas sondas centroméricas para os cromossomas 7, 8, 9 e 17, marcadas com digoxigenina (Oncor®). A técnica de FISH foi realizada de acordo com métodos previamente estabelecidos pelo fabricante (Oncor®), com ligeiras modificações. A microdissecção manual da área tumoral foi realizada de acordo com a indicação do patologista, tendo como objectivo a selecção do tecido tumoral. As lâminas foram desparafinadas e pré-tratadas com tiocianato de sódio (NaSCN) 1M (Merck®) a 80°C, durante 10 minutos e, posteriormente, digeridas com pepsina

(4mg/ml) a 37°C, durante 20 a 25 minutos, em câmara húmida. A desnaturação simultânea da sonda e da amostra foi efectuada em câmara húmida a 80°C, durante 10 minutos, seguida de hibridização, durante a noite, a 37°C. Após a hibridização foram feitas lavagens em 2xSSC (Salt Sodium Citrate, Oncor®) a 70°C, durante 5 minutos, e em 1xPBD (Phosphate Buffered Detergent, Oncor®). Para a detecção foi usado o anticorpo FITC-antidigoxigenina (Oncor®), durante 15 a 20 minutos, em câmara escura. Os núcleos foram contrastados com iodeto de propídio (Oncor®).

2.2.2. Método de quantificação

O método de quantificação utilizado teve como base a contagem do número de sinais de um mínimo de 200 núcleos tumorais, por lâmina, com um microscópio de fluorescência (Nikon®) equipado com uma objectiva de imersão com ampliação de 100x. Os núcleos que se encontravam danificados e/ou com os limites pouco definidos foram excluídos da análise. Mucosas normais foram usadas como controlos e serviram para estabelecer os limites de aneuploidia para as sondas utilizadas. Estes valores de referência estão indicados na tabela 2.2.1. Segundo o critério utilizado, a presença de monossomia ou trissomia/polissomia só foi considerada quando a percentagem de núcleos com 1 ou 3 (ou mais) sinais, respectivamente, foi maior do que a “média + 2x desvio padrão” dos casos controlo [26].

Tabela 2.2.1: Limites de aneuploidia para as sondas usadas neste estudo

	Cromossoma 7	Cromossoma 8	Cromossoma 9	Cromossoma 17
Monossomia (1 sinal/núcleo)	35%	35%	41%	31%
Trissomia/Polissomia (≥3 sinais/núcleo)	5%	3%	3%	5%

2.2.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e percentagens. A análise univariada foi efectuada pelo método do Qui-quadrado (χ^2) e pelo teste exacto de Fisher, quando apropriado. Para o estudo estatístico utilizou-se o programa específico SPSS 8.0®. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

2.3- RESULTADOS

Dos 68 tumores uroteliais estudados, 17 foram classificados como grau I, 28 como grau II e 23 como grau III. Dezoito tumores estavam limitados à mucosa (estádio pTa), 27 invadiam a lâmina própria (estádio pT1) e 23 invadiam a camada muscular (estádios pT2a/pT2b). Relativamente ao padrão morfológico, 48 tumores eram papilares e 20 eram não papilares. (Tabela 2.3.1.)

Tabela 2.3.1: Estádio, grau de diferenciação e morfologia dos carcinomas uroteliais da bexiga estudados

Padrão Morfológico	Grau Histológico	pTa (n=18)	pT1 (n=27)	pT2a/pT2b (n=23)
Papilar	I (n=17)	13	4	0
	II (n=25)	4	20	1
	III (n=6)	1	3	2
Não papilar	II (n=3)	0	0	3
	III (n=17)	0	0	17

As alterações cromossômicas em função do grau estão resumidas na tabela 2.3.2. Relativamente ao cromossoma 7, verifica-se que, à medida que os tumores se vão tornando mais indiferenciados, diminui o número de casos monossômicos e dissômicos, passando a ser prevalente a trissomia. A monossomia do cromossoma 9 (Figura 1) é o evento mais frequente nos tumores de grau I e II. Nos tumores de grau III o evento mais frequente é a trissomia deste cromossoma (Figura 2), não havendo nenhum caso monossômico. Quanto ao cromossoma 17, observa-se que nos tumores de grau I a monossomia ocorre em mais de 50% e a trissomia não ultrapassa os 18%. Estes resultados invertem-se nos tumores de grau II e nos tumores de grau III. Nestes, as trissomias ultrapassam os 90%. Todas as diferenças encontradas foram estatisticamente significativas ($p<0,05$).

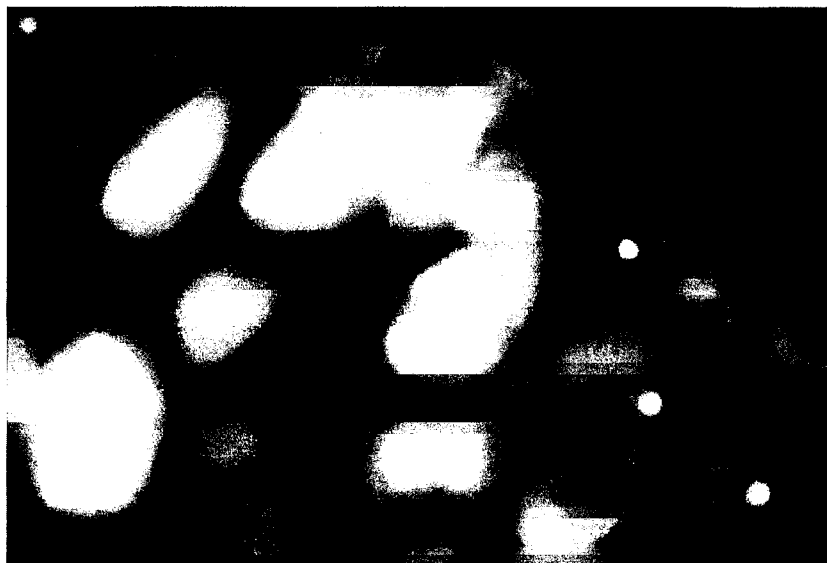


Figura 1- Carcinoma urotelial da bexiga. Monossomia do cromossoma 9 (1000x).

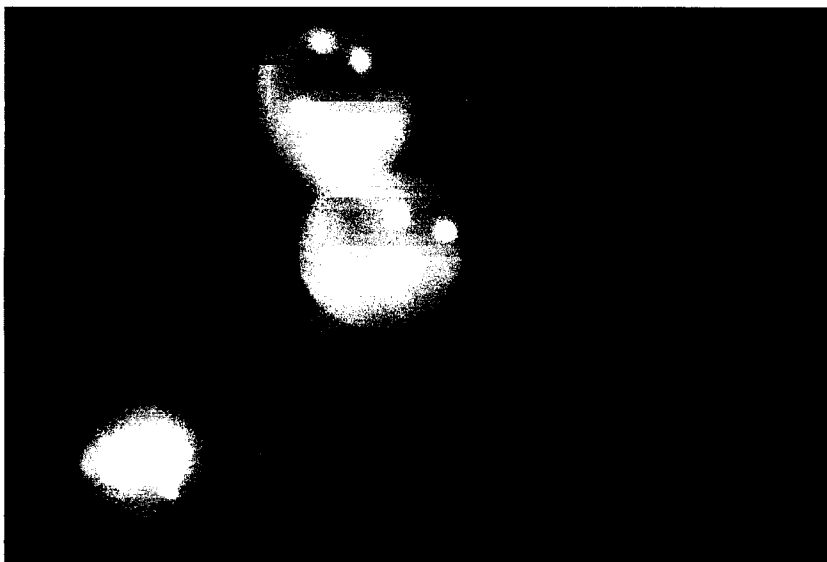


Figura 2- Carcinoma urotelial da bexiga. Trissomia do cromossoma 9 (1000x).

Tabela 2.3.2: Alterações numéricas dos cromossomas 7, 9 e 17, em função do grau

Cromossoma	Ploidia	Grau I	Grau II	Grau III	p
7	Mon	2 (11,7%)	2 (7,1%)	0 (0%)	0,000
	Dis	8 (47,1%)	2 (7,1%)	0 (0%)	
	Tris	7 (41,2%)	24 (85,7%)	23 (100,0%)	
9	Mon	9 (60,0%)	14 (56,0%)	0 (0%)	0,000
	Dis	6 (40,0%)	4 (16,0%)	3 (13,6%)	
	Tris	0 (0%)	7 (28,0%)	19 (86,4%)	
17	Mon	9 (52,9%)	5 (17,9%)	0 (0%)	0,000
	Dis	5 (29,4%)	7 (25,0%)	2 (8,7%)	
	Tris	3 (17,6%)	16 (57,1%)	21 (91,3%)	

Legenda: Mon – monossomia; Dis – dissomia; Tris – trissomia

Na tabela 2.3.3. estão condensados os resultados relativos às alterações numéricas dos cromossomas 7, 9 e 17 em função do estágio. A trissomia do cromossoma 7 é a alteração mais comum em todos os estádios, acontecendo de forma directamente proporcional ao grau de invasão. Nos tumores que não invadem a camada muscular, a monossomia do cromossoma 9 é a alteração cromossómica mais frequente, contudo, nos invasores, o evento dominante é a trissomia. Em relação ao cromossoma 17, à medida que os tumores se tornam mais invasores, verifica-se uma diminuição do número de casos monossómicos e um aumento de casos trissómicos. Todas as diferenças foram estatisticamente significativas ($p<0,05$).

Tabela 2.3.3: Alterações numéricas dos cromossomas 7, 9 e 17 em função do estágio

Cromossoma	Ploidia	pTa	pT1	pT2a/pT2b	p
7	Mon	2 (11,1%)	2 (7,4%)	0 (0%)	0,014
	Dis	6 (33,3%)	4 (14,8%)	0 (0%)	
	Tris	10 (55,6%)	21 (77,8%)	23 (100,0%)	
9	Mon	8 (47,1%)	14 (60,9%)	1 (4,5%)	0,000
	Dis	8 (47,1%)	4 (17,4%)	1 (4,5%)	
	Tris	1 (5,8%)	5 (21,7%)	20 (90,9%)	
17	Mon	8 (44,4%)	6 (22,2%)	0 (0%)	0,001
	Dis	5 (27,8%)	7 (25,9%)	2 (8,7%)	
	Tris	5 (27,8%)	14 (51,9%)	21 (91,3%)	

Legenda: Mon – monossomia; Dis – dissomia; Tris – trissomia

O cromossoma 8 foi estudado apenas nos tumores invasores não papilares (3 casos pT2/GII e 17 casos pT2/GIII), tendo sido observado, em todos, trissomia deste cromossoma.

No conjunto, as alterações cromossómicas observadas ocorreram em 95,6% (43/45) dos tumores superficiais. Destes, 9 casos (20,9%) tinham apenas perdas (monossomias), 13 (30,2%) apenas ganhos (trissomias) e 21 (48,8%) apresentavam perdas e ganhos. Em somente 2 casos (4,4%) não havia alterações cromossómicas (dissomias). Todos os tumores invasores (n=23) apresentavam alterações em pelo menos um dos cromossomas estudados. Em 82,6% destes havia alterações em todos os cromossomas avaliados, predominado o ganho de material (em 94,7%). (Gráficos I, II e III)

Gráfico I – Alterações cromossoma 7 em função do grau e estágio

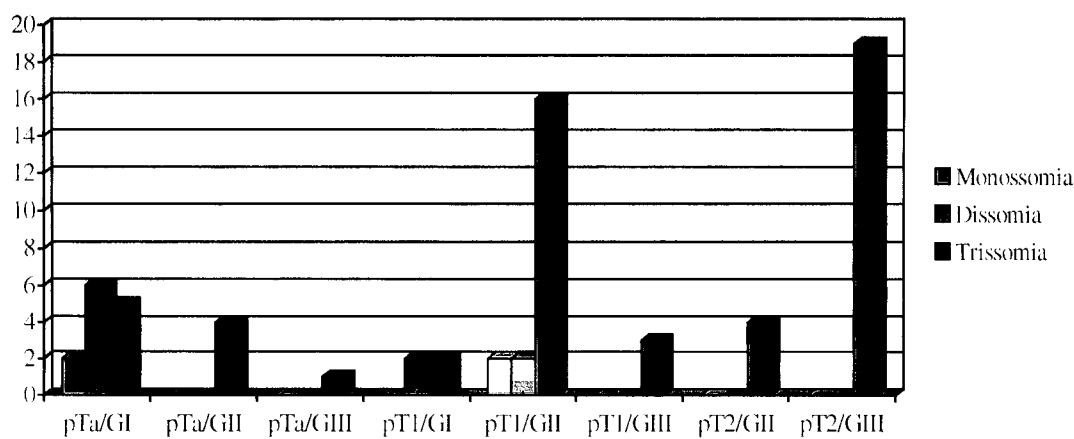


Gráfico II – Alterações do cromossoma 9 em função do grau e estágio

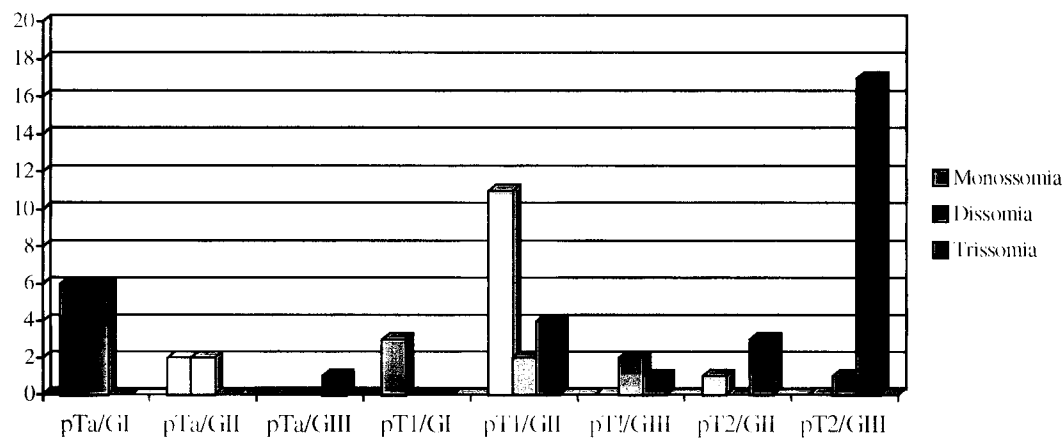
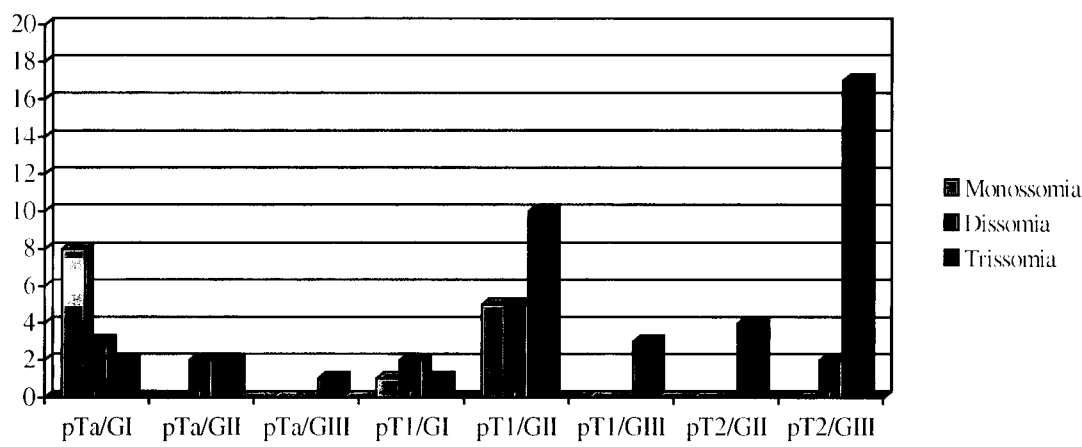


Gráfico III – Alterações do cromossoma 17 em função do grau e estágio



2.4- DISCUSSÃO

Actualmente, o estágio e o grau de diferenciação são as variáveis histopatológicas que possibilitam maior informação sobre o prognóstico dos carcinomas uroteliais da bexiga. Porém, nos carcinomas superficiais de morfologia papilar, estes factores clássicos de prognóstico não são suficientemente discriminantes para que se estratifiquem os doentes em grupos com riscos distintos de progressão [27].

Os tumores superficiais papilares usualmente têm um número menor de alterações cromossómicas comparando com os tumores invasores [28, 29]. Na amostra do presente estudo, observou-se que a acumulação de alterações cromossómicas, nomeadamente trissomias, é directamente proporcional ao grau de invasão do tumor, facto igualmente descrito por Shii e colaboradores [30] e por Pycha e colaboradores [31]. No carcinoma urotelial da bexiga as alterações dos cromossomas 7, 9, 8 e 17 são eventos frequentes e não aleatórios.

Estudos de perda de heterozigotia (LOH) e hibridização genómica comparativa (CGH) revelaram que a deleção do cromossoma 9 é um evento precoce e que é retida durante a progressão [32, 33]. A aneussomia dos cromossomas 7, 8 e 17, também tem sido associada a um maior risco de progressão nos carcinomas uroteliais superficiais [11, 34]. Neste estudo, a perda de uma cópia do cromossoma 9 e a trissomia do cromossoma 7, estudados com recurso a sondas centroméricas, foram as alterações mais frequentes nos tumores superficiais. Hartmann e colaboradores [35] verificaram que 60% dos tumores superficiais tinham monossomia do cromossoma 9, taxa semelhante à encontrada nos tumores superficiais deste trabalho (53,7%). Diversos autores estudaram, em tumores superficiais papilares, o cromossoma 9 na sua globalidade, associando técnicas de FISH e de LOH, correlacionando a perda deste cromossoma com a acumulação nuclear da proteína p53 [36]. Segundo estes trabalho, a perda do centrómero do cromossoma 9 poderá representar as deleções que englobam o braço curto e o braço longo. Estas deleções têm uma frequência elevada nos tumores uroteliais [37]. Em 12 tumores superficiais do presente estudo não foram encontradas alterações do cromossoma 9 (ao nível do centrómero). Nestes observou-se uma monossomia e oito trissomias do cromossoma 7, quatro monossomias e três trissomias do cromossoma 17. Estes dados sugerem a existência de outras vias de carcinogénese

urotelial que não incluem o cromossoma 9.

A trissomia do cromossoma 7 tem sido descrita, em alguns estudos citogenéticos, como uma alteração cromossómica frequente no carcinoma da bexiga [38, 39], e associada ao risco de recidiva em tumores superficiais [40]. A presença de alterações genéticas do cromossoma 7 nos tumores pTa e o aumento da sua frequência com o grau e estágio poderão indicar que alterações deste cromossoma estão relacionadas com o processo de cancerização e progressão neoplásica na bexiga.

O facto das alterações do cromossoma 7 e do cromossoma 9 ocorrerem em tumores iniciais, sugere que a sua associação a um modelo preditivo de progressão em que estão incluídas as variáveis clássicas, não aumentaria o poder discriminatório de grupos de risco. Orlow e colaboradores [41], ilustrando esta asserção, verificaram que nos tumores superficiais da bexiga, a deleção do gene CDKN2A (locus 9p21) se associava à recorrência. Contudo, esta variável não era um factor de prognóstico independente.

Em relação ao cromossoma 8, que nesta amostra apenas foi estudado nos tumores invasores, verificou-se que havia, em todos os casos, ganho de cópias do cromossoma. Em estudos de CGH foram detectados, nos tumores invasores, ganhos do braço longo do cromossoma 8 e perda no braço curto [42, 43]. Outros autores, utilizando FISH, revelaram um aumento do número de cópias deste cromossoma [44]. Num estudo com tumores da bexiga Sauter e colaboradores [45] observaram que o aumento do número de cópias do oncogene c-myc, localizado no 8q, se associou ao aumento de número de cópias deste cromossoma e a taxas elevadas de proliferação celular. Este ganho de cópias do cromossoma 8 pode enquadrar-se nos fenómenos de poliploidização que ocorrem com a progressão.

Otha e colaboradores [46] verificaram que a progressão, considerada como a invasão tumoral, se associou a um crescente aumento do número de cópias do cromossoma 17 e amplificação do gene c-erbB2. Em outros estudos citogenéticos, também se verificou que a polissomia do cromossoma 17 era um evento frequente nos tumores invasores [38, 47]. Estes resultados são concordantes com as alterações observadas na amostra estudada. Contudo, nos tumores superficiais papilares mantém-se a divergência nos resultados relativos às alterações do cromossoma 17, dado que alguns autores referem a prevalência da polissomia e outros referem a existência de perdas parciais do cromossoma, relacionando ambas com o risco de progressão [8, 23, 48, 49]. Estas diferenças obrigam a que este cromossoma seja reavaliado, em conjunto com os genes

TP53 e c-erbB2, e em função do risco de recidiva e/ou progressão nos carcinomas superficiais papilares.

2.5- CONCLUSÕES

Por se terem utilizado sondas centroméricas neste estudo, não é possível avaliar o que acontece nos braços cromossómicos. Verificou-se um aumento da frequência de trissomias de todos os cromossomas com o aumento da invasão tumoral. Este facto pode ser o reflexo da poliploidização do tumor, mais do que da existência de anomalias cromossómicas específicas dos tumores invasores. Este número crescente de alterações cromossómicas e do conteúdo de DNA, sugere que na transformação maligna do urotélio e na progressão dos carcinomas uroteliais a instabilidade genómica é um factor importante.

Neste trabalho, as alterações dos cromossomas 7 e 9 não são discriminatórias de grupos de risco. Porém, existem tumores sem alterações numéricas do cromossoma 9 mas com alterações dos cromossomas 7 e 17. O comportamento biológico deste genótipo ainda não está definido. Neste sentido, as alterações do cromossoma 17 poderão ser de grande importância. Também será necessário a caracterização dos genes TP53 e *c-erbB2* em termos de prognóstico em carcinomas uroteliais superficiais papilares e invasores, bem como dos genes localizados nos braços do cromossoma 9.

2.6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Tsai Y., Nichols P., Hiti A., Williams Z., Skinner G., Jones P. Allelic losses of chromosome 9, 11 and 17 in human bladder cancer. *Cancer Res.* 50: 44-47. 1990.
- 2- Sandberg A. Chromosome changes in early bladder neoplasms. *J Cell Biochem Suppl.* 16I: 76-79. 1992.
- 3- Poddighe P., Ramaekers F., Hopman A. Interphase cytogenetics of tumours. *J Pathol.* 166: 215-224. 1992.
- 4- Dalbagni G., Presti J., Reuter V., Fair W., Cordon-Cardo C. Genetic alterations in bladder cancer. *Lancet.* 342: 469-471. 1993.
- 5- Waldman F., Carrol P., Kerschmann R., Cohen M., Field F., Mayall B. Centromeric copy of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. *Cancer Res.* 51: 3807-3813. 1991.
- 6- Sandberg A., Berger C. Review of chromosome studies in urologic tumors. II. Cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. *J Urol.* 151: 545-560. 1994.
- 7- Knowles M., Elder P., Williamson M., Cairns J., Shaw M., Law M. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res.* 54: 531-538. 1994.
- 8- Spruck III C., Ohneseit P., Zulueta M., Esrig D., Miyao N., Tsai Y., Lerner S., Schmütte C., Yang A., Cote R., Dubeau L., Nichols P., Hermann G., Steven K., Horn T., Skinner D., Jones P. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 54: 784-788. 1994.
- 9- Knowles M. Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. *Cancer Surveys - Bladder Cancer.* 31: 49-81. 1998.

- 10- Sidransky D. Molecular detection of superficial bladder cancer. Am Soc Clin Oncol. Educational Book. pp 503-506. 1999.
- 11- Sandberg A. Chromosome changes in bladder cancer: clinical and other correlations. Cancer Genet Cytogenet. 19: 163-175. 1986.
- 12- Perucca D., Szepietowski A., Simon P., Gaudray P. Molecular genetics of human bladder carcinomas. Cancer Genet Cytogenet. 49: 143-156. 1990.
- 13- Knowles M., Shaw M., Proctor A. Deletion mapping of chromosome 8 in cancers of the urinary bladder using restriction fragment length polymorphisms and microsatellite polymorphisms. Oncogene. 8: 1357-1364. 1993.
- 14- Ohgati K., Iida A., Ogawa O., Kubota Y., Akimoto M., Emi M. Localization of tumor suppressor gene associated with distant metastasis of urinary bladder cancer to a 1-Mb interval on 8p22. Genes Chromos Cancer. 25: 1-5. 1999.
- 15- Bruch J., Wöhr G., Hautmann R., Mattfeldt T., Bruderlein S., Möller P., Sauter S., Hameister H., Vogel W., Paiss T. Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. Genes Chromos Cancer. 23: 167-174. 1998.
- 16- Knowles M. Molecular genetics of bladder cancer. Br J Urol. 75: 57-66. 1995.
- 17- Gibas Z., Gibas L. Cytogenetics of bladder cancer. Cancer Genet Cytogenet. 95: 108-115. 1997.
- 18- Cairns P., Shaw M., Knowles M. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumour suppressor gene on chromosome 9. Oncogene. 8: 1083-1085. 1993.
- 19- Gursky S., Olopaded O., Rowley J. Identification of a 1.2 Kb cDNA fragment from a region on 9p21 commonly deleted in multiple tumor types. Cancer Genet Cytogenet. 129: 93-101. 2001.

- 20- Tilborg A., Groenfeld L., Kwast T., Zuarthoff E. Evidence for two candidate tumour suppressor loci on chromosome 9q in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder but no homozigous deletions in bladder tumour cell lines. *B J Cancer*. 80: 489-494. 1999.
- 21- Orlow I., Lianes P., Lacombe L., Dalbagni G., Reuter V., Cordon-Cardo C. Chromosome 9 allelic losses and microsatellite alterations in human bladder tumours. *Cancer Res*. 54: 2848-2851. 1994.
- 22- Rabbani F., Cordo-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 27: 83-102. 2000.
- 23- Neuhaus M., Wagner U., Schmid U., Ackermann D., Zellweger T., Maurer R., Alund G., Knönagel H., Rist M., Moch H., Mihatsch M., Gasser T., Sauter G. Polysomies but not Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Hum Pathol*. 30: 81-86. 1999.
- 24- Mostofi FK, Sorbin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. International Classification of Tumours 19. World Health Organization. Geneva. 1973.
- 25- AJCC Cancer Staging Manual. American Joint Committee on Cancer. 5th ed. Philadelphia. Lippincott – Raven. 1997.
- 26- Matsuyama H., Pan Y., May E., Malmström PU., Hedrum A., Uhlen M., Busch C., Hirano T., Auer G., Tribukait B., Naito K., Lichter P., Ekman P., Bergerheim U. p53 deletion as a genetic marker in urothelial tumor by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res*. 54: 6057-6060. 1994.
- 27- Zlotta A., Schulman C. Biological markers in superficial bladder tumors and their prognostic significance. *Urol Clin North Am*. 27: 179-189. 2000.

- 28- Richter J., Jiang F., Gorog J., Sartorius G., Egenter C., Gasser T., Moch H., Mihatsch M., Sauter G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 57: 2860-2864. 1997.
- 29- Fadl-Elmula I., Gorunova L., Mandahl N., Elfving P., Lundgren R., Mitelman F., Heim S. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromos Cancer.* 29: 256-265. 2000.
- 30- Shii N., Ariyoshi A., Kinjo M., Sasaki K. Detection of numerical chromosomal aberrations in bladder carcinomas by fluorescence *in situ* hybridization. *J Urol Pathol.* 7: 21-32. 1997.
- 31- Pycha A., Mian C., Posch B., Haitel A., El-Baz M., Ghoneim M., Marberger M. Numerical aberrations of chromosomes 7, 9 and 17 in squamous cell and transitional cell cancer of the bladder: a comparative study performed by fluorescence in situ hybridization. *J Urol.* 160: 737-740. 1998.
- 32- Bartlett J., Waters A., Ballantyne S., Going J., Grigor K., Cooke T. Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br J Cancer.* 77: 2193-2198. 1998.
- 33- Eleuteri P., Grollino M., Pomponi D., De Vita R. Chromosome 9 aberrations by fluorescence in situ hybridization in bladder transitional cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 37: 1496-1503. 2001.
- 34- Simon R., Burger H., Brinkschmidt C., Bocker W., Hertle L., Terpe H. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J Pathol.* 185: 345-351. 1998.
- 35- Hartmann A., Rösner U., Schlake G., Dietmaier W., Zaak D., Hofstaedter F., Knuechel R. Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest.* 80: 709-718. 2000.

- 36- Stadler W., Steinberg G., Yang X., Hagos F., Turner C., Olopade O. Alterations of the 9p21 and 9q33 chromosomal bands in clinical bladder cancer specimens by fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 7: 1676-1682. 2001.
- 37- Knowles M. What we could do now: molecular pathology of the bladder cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 54:215-221. 2001.
- 38- Babu V., Lutz M., Miles B., Farah R., Weiss L., Van Dyke D. Tumor behavior in transitional cell carcinoma of the bladder in relation to chromosomal markers and histopathology. *Cancer Res.* 47: 6800-6805. 1987.
- 39- Smeets A., Panwels R., Laarakkers L., Debruyne F., Geraedts J. Chromosome analysis of bladder cancer III. Nonrandom alterations. *Cancer Genet Cytogenet.* 29: 29-41. 1987.
- 40- Pycha A., Mian C., Haitel A., Hofbauer J., Wiener H., Marberger M. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J Urol.* 157: 2116-2119. 1997.
- 41- Orlow I., LaRue H., Osman I., Lacombe L., Moore L., Rabbani F., Meyer F., Fradet Y., Cordon-Cardo C. Deletions of the INK4A gene in superficial bladder tumors. Association with recurrence. *Am J Pathol.* 155: 105-113. 1999.
- 42- Takle L., Knowles M. deletion mapping implicates two tumor suppressor genes on chromosome 8p in the development of bladder cancer. *Oncogene.* 7: 1083-1087. 1996.
- 43- Wagner U., Bubendorf L., Gasser T Moch H., Gorog J., Richter J., Mihatsch M., Waldman F., Sauter G. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. *Am J Pathol.* 151: 753-759. 1997.
- 44- Awata S., Sakagami H., Tozawa K., Sasaki S., Ueda K., Kohri K. Aberrations of chromosome 8 and 11 in bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. *Urol Res.* 28: 185-190. 2000.

- 45- Sauter G, Carroll P, Moch H, et al. c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol.* 146: 1131-1139. 1995.
- 46- Ohta J., Miyoshi Y., Uemura H., Fujinami K., Mikata K., Hosaka M., Tokita Y., Kubota Y. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 7: 2463-2467. 2001.
- 47- Sauter G., Moch H., Moore D., Carrol P., Kerschmann R., Chew K., Mihatsch M., Gudat F., Waldman F. Heterogeneity of *erbB2* gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res.* 53: 2199-2203. 1993.
- 48- Reznikoff C., Belair C., Yeager T., Savelieva E., Blelloch R., Puthenveettil J., Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Seminars Oncol.* 23: 571-584. 1996.
- 49- Zhang F., Arber D., Timothy W., Kawachi M., Slovak M. Toward the validation of aneusomy detection by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer: comparative analysis with cytology, cytogenetics, and clinical features predicts recurrence and defines clinical testing limitations. *Clin Cancer Res.* 3: 2317-2328. 1997.

3- ALTERAÇÕES DOS GENES TP53 E C-ERBB-2 E PROTEÍNAS ASSOCIADAS, E ESTUDO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR (KI-67) NOS CARCINOMAS UROTELIAIS SUPERFICIAIS PAPILARES E INVASORES

3.1- INTRODUÇÃO

Os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais estão envolvidos na regulação do ciclo celular, morte celular programada (apoptose) e no controlo da proliferação [1]. Genes supressores envolvidos nestes controlos, como os que codificam as proteínas p53, p15, p16, p14^{ARF}, pRb, têm sido objecto de intenso estudo [2]. Tanto o gene TP53 como o gene Rb podem sofrer deleção ou mutação associando-se, assim, ao processo de carcinogénese de numerosos tumores malignos no adulto, como o cancro do pulmão, da mama ou da bexiga [3, 4, 5].

Actualmente, o papel dos oncogenes na carcinogénese da bexiga é menos claro que o observado pelos genes supressores tumorais após a perda de função. Contudo, há oncogenes cujo envolvimento no desenvolvimento do cancro da bexiga e no processo de progressão é conhecido, entre eles estão o c-erbB2, o *Ras*, o EGFR e o MDM2 [2].

Gene TP53

O gene TP53, localizado no cromossoma 17p13.1, codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa que é induzida pelo *stress* celular, e cujas principais funções são a paragem do ciclo celular (em G1) e a indução da apoptose, no sentido da preservação da estabilidade genómica [6]. Estas actividades decorrem da activação de genes que permitem a inibição da replicação do DNA e a sua reparação [7].

As mutações do gene TP53 têm sido associadas à instabilidade genómica e ao desenvolvimento progressivo de outras mutações em outros loci. As mutações do gene resultam, na maioria das vezes, na codificação de uma proteína anormal, cujo tempo médio de vida é maior do que o da proteína normal permitindo, assim, a sua detecção através de métodos imunohistoquímicos [5]. A deleção deste gene/perda do 17p não é frequentemente observada nos carcinomas superficiais de bexiga, à excepção dos tumores papilares de alto grau e dos carcinomas *in situ* [2, 8].

A expressão imunohistoquímica da proteína p53 nos carcinomas uroteliais é um assunto controverso. De acordo com Schmitz-Dräger e colaboradores [9], a proteína p53

é avaliada com recurso a anticorpos diferentes e a métodos de contagem diversos e, por este motivo, os resultados obtidos não são concordantes. Lipponen [10] estudou uma amostra com um número importante de casos, e verificou que a acumulação nuclear da proteína p53 se associava a carcinomas de alto grau, com padrão não papilar, com densa reacção inflamatória do estroma, aneuplóides, com elevada fracção da fase S e com um elevado número de mitoses. Por outro lado, no mesmo estudo, a progressão estabelecida através do T.N.M. relacionava-se significativamente com a expressão da proteína p53. Embora na análise univariada esta expressão imunohistoquímica indique mau prognóstico apenas nos carcinomas papilares invasores, na análise multivariada não se identificou a expressão do produto do gene TP53 como factor independente de prognóstico.

Aproximadamente 40% dos tumores da bexiga com invasão da camada muscular apresentam acumulação nuclear da proteína p53. Nos tumores com invasão da lâmina própria (pT1), apesar de ser menos frequente, a expressão desta proteína está associada a um maior risco de progressão da doença. A alteração do *status* da proteína p53 é também preditiva de diminuição da sobrevivência global. Nos carcinomas com invasão da camada muscular, a expressão da proteína tem sido associada a uma duplicação do risco de morte por cancro da bexiga [11]. Os carcinomas *in situ* com imunorreactividade superior a 20% têm um intervalo livre de doença significativamente mais curto e uma menor sobrevivência global [12]. O referido cut-off foi associado a uma elevada taxa de mutações [13]. Estes dados indiciam que o p53 está envolvido no desenvolvimento e progressão dos tumores da bexiga de alto grau.

Gene *c-erb2* (HER2/neu)

A amplificação de oncogenes é encontrada em muitos tumores sólidos e, usualmente, está associada a maior agressividade. O oncogene *c-erbB2* corresponde a uma das regiões mais frequentemente amplificadas em tumores distintos, como o cancro da mama ou o do ovário. Tanto a sua amplificação como a sobreexpressão estão associadas a um mau prognóstico [14].

O gene *c-erbB2*, também designado por *HER2/neu*, está localizado no cromossoma 17q21 e codifica uma fosfoglicoproteína transmembranar de 185 KDa, que é homóloga ao receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR). A proteína *c-erbB2* é um

receptor celular de membrana e tem a capacidade de estimular o crescimento celular [15]. Quando existe amplificação do gene e/ou sobreexpressão da proteína, há uma activação dos sistemas de sinalização que promovem o crescimento celular, a angiogénese, o aparecimento de metástases, e outras vias procarcinogénicas [16].

O significado prognóstico da sobreexpressão da proteína c-erbB2 no carcinoma urotelial de bexiga é ainda controverso, uma vez que em muitos trabalhos os resultados são contraditórios [17]. Estudos moleculares revelaram discrepância entre a amplificação génica e a sobreexpressão proteica [15]. No entanto, sabe-se que a expressão elevada do produto deste oncogene se associa a tumores de elevado grau, invasores, aneuplóides, proliferativos, estágio avançado e com envolvimento ganglionar ou metastização à distância no momento do diagnóstico inicial. Os estudos sugerem um menor intervalo livre de doença e uma menor sobrevivência global nestes tumores com imunoreactividade para a proteína c-erbB2, mas a análise multivariada não indicia que este seja um factor de prognóstico independente. A imunoreactividade para a proteína c-erbB2 é muito ligeira nas mucosas normais e em alguns tumores de baixo grau [18-22]. Neste momento, no carcinoma da mama com amplificação do gene, o bloqueio do receptor com anticorpos monoclonais, produziu um aumento da sobrevivência global [23]. A sobreexpressão da proteína c-erbB2 nos tumores uroteliais da bexiga primários não se associou a variações significativas na sobrevivência dos doentes com carcinomas invasores da bexiga. Porém, os tumores primários c-erbB2 positivos usualmente tinham metástases à distância também positivas [17]. Ohta e colaboradores [15] detectaram amplificação do gene, e também um aumento de cópias do cromossoma 17, nos tumores uroteliais da bexiga mais avançados. Estes resultados em conjunto sugerem que, se nos carcinomas uroteliais da bexiga a acção terapêutica dos anticorpos monoclonais anti-c-erbB2 for sobreponível à observada na mama, esta pode ser mais uma opção terapêutica nos tumores avançados da bexiga com alteração deste gene .

Índice Proliferativo Ki-67

A proliferação celular tem sido estudada como factor de prognóstico no carcinoma da bexiga. Os marcadores mais utilizados são o antigénio Ki-67 e o PCNA (proliferating cell nuclear antigen) [24]. O Ki-67 tem sido descrito como um bom marcador da actividade proliferativa de muitos tumores, incluindo o cancro da bexiga [25].

O anticorpo monoclonal MIB-1 detecta a proteína nuclear Ki-67, codificada por um gene localizado no cromossoma 10, e que é expressa por células que estejam em fase activa do ciclo celular (G_1 , S, G_2 ou M), mas não por células na fase passiva (G_0) [26].

Estudos de proliferação celular como meio preditivo do comportamento biológico dos carcinomas uroteliais de bexiga são inúmeros. A expressão do Ki-67 tem sido correlacionada, em tumores de diferentes órgãos, com factores clinicopatológicos e de prognóstico, e também com alterações em genes supressores tumorais, entre os quais o TP53 [27]. Tem-se associado a expressão do Ki-67 a um maior risco de recorrência e progressão de tumores superficiais da bexiga [28, 29].

Neste estudo, o objectivo foi comparar as alterações dos genes TP53 e c-erbB2 e das suas proteínas associadas, nos carcinomas uroteliais superficiais papilares e invasores da bexiga, bem como avaliar o índice proliferativo nos dois sub-grupos, na tentativa de estabelecer a utilidade terapêutica da avaliação destas alterações.

3.2- MATERIAL E MÉTODOS

Com recurso à amostra de carcinomas uroteliais estudada no trabalho anterior, procedeu-se ao estudo imunohistoquímico das proteínas p53, c-erbB2 e Ki-67. Foram também estudados os genes TP53 e c-erbB2 pela técnica de FISH usando sondas de sequência única.

3.2.1 - Técnica imunohistoquímica

O estudo da imunorreactividade para as proteínas p53, Ki-67 e c-erbB2 foi efectuado pelo método de Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC-complexo, *Dako*[®] 0355), em cortes de tumor com 3 µm montados em lâminas de vidro revestidas com 3-aminopriltroxilano (C₉H₂₃NO₃Si) (Sigma Chemical Co.). Realizou-se a recuperação antigénica em tampão citrato pH 6,0 no microondas a 600W, durante 10 minutos. As diluições dos anticorpos monoclonais utilizadas foram as seguintes: p53 (*DO7*, *Dako*[®]) 1:50, Ki-67 (*MIB-1*, *Novocastra*[®]) 1:200 e c-erbB2 (*CB-11*, *Biogenex*[®]) 1:40. Foi feita incubação com o anticorpo primário durante 18 horas a 4°C e em câmara húmida. A revelação realizou-se com a incubação dos cortes numa solução de Tris/HCl a 0,05M com 0,05% de 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorida e 0,01% de peróxido de hidrogénio. O contraste dos núcleos foi realizado com hematoxilina de Harris. Todas as séries incluíram um controlo negativo, substituindo-se o anticorpo primário por BSA a 2,5% em TBS, e um controlo positivo com imunorreactividade conhecida para o anticorpo monoclonal em estudo.

3.2.2 - Quantificação da imunorreactividade dos anticorpos monoclonais utilizados

O método de quantificação utilizado teve como base a contagem da imunorreactividade em 200 células tumorais e a avaliação semiquantitativa de todo o corte histológico.

p53 - O método utilizado teve em conta os princípios propostos por Hall e Lane [30]. Foram considerados como *negativos* os casos cuja imunorreactividade nuclear era inferior a 20% e em que as células marcadas não eram contíguas, e como *positivos* os casos cuja imunorreactividade era $\geq 20\%$ em células contíguas.

Ki-67 – Consideraram-se como *positivos* os casos em que a percentagem de núcleos marcados era $\geq 20\%$, de acordo com os critérios utilizados por Gontero e colaboradores [31].

c-erbB2 – Consideraram-se como *positivos* os casos em que 10% ou mais de células contíguas tinham marcação membranar e/ou citoplasmática inequívoca moderada a forte, critérios também utilizados por Jimenez e colaboradores [17].

3.2.3 - Técnica de hibridização in situ de fluorescência (FISH)

Para o estudo do FISH procedeu-se da mesma forma que o descrito no trabalho anterior, diferindo apenas no tipo de sondas. Foram usadas duas sondas de sequência única para os genes TP53 e c-erbB2, marcadas com digoxigenina (Oncor®) respectivamente. Procedeu-se à amplificação do sinal nos casos julgados necessários, usando os anticorpos Rabbit Anti-Sheep e FITC/Anti-Rabbit c, de acordo com as instruções do fabricante.

Segundo o critério utilizado a presença de monossomia ou trissomia/polissomia só foi considerada quando a percentagem de núcleos com 1 ou 3 (ou mais) sinais, respectivamente, for maior do que a “média + 2x desvio padrão” dos casos controlo (Tabela 3.2.1.) [32].

Tabela 3.2.1: Limites de aneuploidia para as sondas usadas neste estudo.

	TP53	c-erbB2
Monossomia (1 sinal/núcleo)	32%	30%
Trissomia/Polissomia (≥ 3 sinais/núcleo)	3%	3%

3.2.4 - Análise estatística

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e percentagens. A análise univariada foi efectuada pelo método do Qui-quadrado (χ^2) e pelo teste exacto de Fisher, quando apropriado. Para o estudo estatístico utilizou-se o programa específico SPSS 8.0®. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

3.3- RESULTADOS

Dos 68 tumores uroteliais, 17 foram classificados como Grau I, 28 como Grau II e 23 como Grau III. Dezoito tumores estavam limitados à mucosa (estádio pTa), 27 invadiram a lâmina própria (estádio pT1) e 23 invadiam a camada muscular (estádios pT2a/pT2b). Em relação ao padrão morfológico, 48 tumores eram papilares e 20 não papilares. (Tabela 3.3.1)

Tabela 3.3.1: Estádio, grau de diferenciação e morfologia dos carcinomas uroteliais da bexiga estudados

Padrão Morfológico	Grau Histológico	pTa (n=18)	pT1 (n=27)	pT2a/pT2b (n=23)
Papilar	I (n=17)	13	4	0
	II (n=25)	4	20	1
	III (n=6)	1	3	2
Não papilar	II (n=3)	0	0	3
	III (n=17)	0	0	17

– Estudo por FISH

Na tabela 3.3.2. estão representados os resultados referentes às alterações dos genes estudados em função do grau de diferenciação. Relativamente às alterações do gene TP53, verifica-se que a monossomia (Figura 1) é o evento mais frequente nos tumores de grau I. Nos tumores de grau II observa-se uma diminuição dos casos monossômicos e um consequente aumento dos casos trissômicos (Figura 2). Os tumores de grau III são, na sua maioria, trissômicos ($p<0,05$).

A presença da monossomia do gene c-erbB2 é mais frequente nos tumores de grau I, diminuindo com a perda de diferenciação celular. As trissomias deste gene estão presentes em maior número nos tumores de grau III. Quanto à amplificação do gene c-erbB2 (Figura 3), esta verifica-se, exclusivamente, em tumores com grau mais elevado (grau II e grau III) ($p<0,05$).

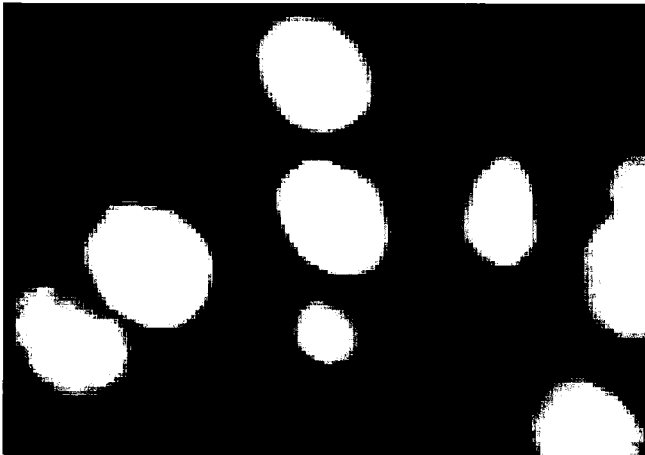


Figura 1- Carcinoma urotelial da bexiga. Monossomia do gene TP53 (1000x).



Figura 2- Carcinoma urotelial da bexiga. Polissomia do gene TP53 (1000x).



Figura 3- Carcinoma urotelial da bexiga. Amplificação do gene c-erbB2 (1000x).

Tabela 3.3.2: Alterações dos genes TP53 e c-erbB2 em função do grau

Gene	Ploidia	Grau I	Grau II	Grau III	p
TP53	Mon	9 (52,9%)	10 (35,7%)	1 (4,3%)	0,002
	Dis	4 (23,5%)	4 (14,3%)	2 (8,7%)	
	Tris	4 (23,5%)	14 (50,0%)	20 (87,0%)	
c-erbB2	Mon	5 (29,4%)	5 (17,9%)	0 (0%)	0,007
	Dis	4 (23,5%)	4 (14,3%)	0 (0%)	
	Tris	8 (47,1%)	18 (64,3%)	19 (82,6%)	
	Amplif	0 (0%)	1 (3,5%)	4 (17,4%)	

Legenda: Mon – monossomia; Dis – dissomia; Tris – trissomia; Amplif – amplificação

As alterações dos genes TP53 e c-erbB2 em função do estágio dos tumores estão resumidos na Tabela 3.3.3. As monossomias do gene TP53 representam 50% dos tumores pTa. Este valor vai decrescendo à medida que aumenta o grau de invasão. Pelo contrário, e no que diz respeito à trissomia, esta vai aumentando com o aumento do estágio ($p<0,05$).

Relativamente ao gene c-erbB2, verifica-se que em todos os estádios há uma predominância de tumores trissômicos, ocorrendo a taxa mais elevada nos tumores invasores. As monossomias deste gene só ocorreram nos casos sem invasão muscular. Todos os casos com amplificação do gene c-erbB2 eram invasores ($p<0,05$).

Tabela 3.3.3: Alterações dos genes TP53 e c-erbB2 em função do estágio

Gene	Ploidia	pTa	pT1	pT2a/pT2b	p
TP53	Mon	9 (50,0%)	11 (40,7%)	0 (0%)	0,003
	Dis	3 (16,7%)	3 (11,1%)	4 (17,4%)	
	Tris	6 (33,3%)	13 (48,1%)	19 (82,6%)	
c-erbB2	Mon	6 (33,3%)	4 (14,8%)	0 (0%)	0,001
	Dis	3 (16,7%)	5 (18,5%)	0 (0%)	
	Tris	9 (50,0%)	18 (66,7%)	18 (78,3%)	
	Amplif	0 (0%)	0 (0%)	5 (21,7%)	

Legenda: Mon – monossomia; Dis – dissomia; Tris – trissomia; Amplif – amplificação

– Estudo imunohistoquímico

De acordo com a tabela 3.3.4., verifica-se que a acumulação da proteína p53 é independente do grau (Figura 4) ($p=0,999$).

No caso da proteína c-erbB2, observa-se um aumento do número de tumores com expressão à medida que aumenta o grau do tumor (Figura 5) ($p=0,374$).

Nos tumores graus I e II o índice proliferativo é significativamente menor que nos carcinomas grau III (Figura 6) ($p=0,016$).

Tabela 3.3.4: Expressão das proteínas p53, c-erbB2 e Ki-67, em função do grau

Proteína	Expressão	Grau I	Grau II	Grau III	p
p53	Negativo	3 (17,6%)	5 (17,9%)	4 (17,4%)	0,999
	Positivo	14 (82,4%)	23 (82,1%)	19 (82,6%)	
c-erbB2	Negativo	16 (94,1%)	24 (85,7%)	18 (78,3%)	0,374
	Positivo	1 (5,9%)	4 (14,3%)	5 (21,7%)	
Ki-67	Negativo	9 (52,9%)	17 (60,7%)	5 (21,7%)	0,016
	Positivo	8 (47,1%)	11 (39,3%)	18 (78,3%)	

A tabela 3.3.5. mostra a expressão das proteínas estudadas nos tumores, em função do estágio. A acumulação nuclear da proteína p53 está presente em todos os estádios, sendo o evento mais frequente ($p=0,198$).

A expressão da proteína c-erbB2 é directamente proporcional à invasão tumoral ($p<0,05$).

Verifica-se que nos tumores pTa há uma maior percentagem de casos com ausência de proliferação ($p=0,241$).

Tabela 3.3.5: Expressão das proteínas p53, c-erbB2 e Ki-67, em função do estágio

Proteína	Expressão	pTa	pT1	pT2a/pT2b	p
P53	Negativo	4 (22,2%)	2 (7,4%)	6 (26,1%)	0,198
	Positivo	14 (77,8%)	25 (92,6%)	17 (73,9%)	
c-erbB2	Negativo	17 (94,4%)	25 (92,6%)	16 (69,6%)	0,032
	Positivo	1 (5,6%)	2 (7,4%)	7 (30,4%)	
Ki-67	Negativo	11 (61,1%)	12 (44,4%)	8 (34,8%)	0,241
	Positivo	7 (38,9%)	15 (55,6%)	15 (65,2%)	



Figura 4- Carcinoma urotelial da bexiga. Acumulação nuclear da proteína p53 (200x).



Figura 5- Carcinoma urotelial da bexiga. Imunoexpressão da proteína c-erbB2 (400x).



Figura 6- Carcinoma urotelial da bexiga. Acumulação nuclear da proteína Ki-67 (200x).

Os casos com monossomia do TP53 revelaram, na sua maioria, acumulação nuclear da proteína p53 (tabela 3.3.6.) (p=0,009).

Tabela 3.3.6: Alterações do gene TP53 em função da expressão da proteína p53

		Gene TP53			p
		monossomia	dissomia	trissomia	
Proteína p53	negativo	1 (5,0%)	5 (50,0%)	6 (15,8%)	0,009
	positivo	19 (95,0%)	5 (50,0%)	32 (84,2%)	

Relativamente ao gene c-erbB2, não se observou nenhum caso com monossomia que tivesse expressão da proteína c-erbB2 (tabela 3.3.7.) (p=0,010).

Tabela 3.3.7: Alterações do gene c-erbB2 em função da expressão da proteína c-erbB2

		Gene c-erbB2				p
		monossomia	dissomia	trissomia	amplificação	
Proteína c-erbB2	negativo	10 (100,0%)	8 (100,0%)	38 (84,4%)	2 (40,0%)	0,010
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	7 (15,6%)	3 (60,0%)	

A tabela 3.3.8. mostra que o índice proliferativo é independente das alterações do gene TP53, no entanto verifica-se que os casos dissômicos para este gene são maioritariamente positivos para o Ki-67 (p=0,426).

Relativamente ao gene c-erbB2, também se observa que não há associação significativa entre este gene e a proteína Ki-67. Os casos dissômicos são os que apresentam um menor índice de proliferação (p=0,321).

Tabela 3.3.8: Expressão da proteína Ki-67 em função das alterações dos genes TP53 e c-erbB2

	Ploidia	Ki-67		p
		negativo	positivo	
TP53	Mon	11 (55,0%)	9 (45,0%)	0,426
	Dis	3 (30,0%)	7 (70,0%)	
	Tris	17 (44,7%)	21 (55,3%)	
c-erbB2	Mon	5 (50,0%)	5 (50,0%)	0,321
	Dis	6 (75,0%)	2 (25,0%)	
	Tris	18 (40,0%)	27 (60,0%)	
	Amplif	2 (40,0%)	3 (60,0%)	

Legenda: Mon – monossomia; Dis – dissomia; Tris – trissomia

3.4- DISCUSSÃO

Neste estudo a monossomia do gene TP53 revelou-se um acontecimento precoce no processo de carcinogénese, ocorrendo em mais de 50% dos tumores de grau I e em 50% dos casos pTa, diminuindo a sua frequência com a perda de diferenciação e invasão da parede muscular pelo tumor. Nestes casos o ganho de cópias do gene TP53 foi o evento mais frequente, associado ao aumento de cópias do cromossoma 17 (capítulo 2). A expressão da proteína foi, na maior parte dos casos, positiva e não variou significativamente com o grau e estágio. Os casos monossómicos tiveram, na sua maioria, acumulação nuclear da proteína. A perda do braço curto do cromossoma 17 e a perda de heterozigotia da mesma região têm sido descritos como eventos frequentes nos carcinomas uroteliais, nomeadamente nos avançados [13, 33-35]. No entanto, estes dados não coincidiram com os resultados do presente estudo.

Em relação aos tumores pouco diferenciados e invasores o ganho do cromossoma 17 foi predominante, como se verificou no capítulo 2, e coincidiu com a trissomia do gene *c-erbB2*. Este aspecto foi também observado por outros autores, nomeadamente Pycha e colaboradores [36] (trissomia do 17) e Ohta e colaboradores [15] (trissomia do 17 e do *c-erbB2*).

Prat e o seu grupo [37], em estudos de hibridização genómica comparativa (CGH) revelaram que em tumores avançados havia ganhos do cromossoma 17q, não detectando perdas do 17p, estas restringiam-se apenas aos carcinomas superficiais. Esta observação é coincidente com o estudo de Matsuyama e colaboradores [32], que detectaram em 48% dos tumores superficiais LOH para o gene TP53, e em 46% destes, acumulação nuclear da proteína p53. O grupo de Hartmann [38], estudando tumores superficiais e de baixo grau, verificou a existência de deleção do gene TP53 por FISH em apenas 6% dos casos, sublinhando, no entanto, que os seus resultados por FISH e por LOH tinham uma boa correlação. Nos tumores superficiais não está claramente estabelecido e de forma definitiva quais são as alterações prevalentes do gene TP53.

A perda de um alelo do gene TP53 foi observada em 46,3% dos tumores superficiais e 95% destes exprimiam acumulação nuclear da proteína p53. Este facto sugere que pode haver um mecanismo para a inactivação do gene na carcinogénese do urotélio, de dois eventos sucessivos - primeiro a deleção de um alelo do gene TP53 e

posteriormente a mutação do alelo restante, tal como acontece em outros modelos [39]. Esta hipótese foi também sugerida por Matsuyama e colaboradores [32] em carcinomas da bexiga e por Nakai e colaboradores [40] em leucemias mielóides crónicas.

As alterações na regulação do ciclo celular liderada pelo gene TP53 poderão implicar, nos tumores superficiais com este genótipo (delecção e/ou mutação do TP53), uma taxa de proliferação elevada e, eventualmente, um risco acrescido de progressão tumoral. Todavia, no presente estudo, a expressão do Ki-67 nos casos com monossomia do TP53 foi de 45% (9/20) e o grupo dissómico para este gene foi o que teve maior taxa de casos com expressão da proteína Ki-67, embora esta diferença não fosse estatisticamente significativa. O risco de progressão não foi avaliado neste trabalho. Estarão envolvidos outros genes potenciais que regulam o ciclo celular?

Otha e colaboradores [15] encontraram uma taxa de trissomia para o *c-erbB2*, no grupo dos tumores invasores, de 63,6%, contudo, estes correspondiam a casos com aumento do número de cópias do cromossoma 17 (centrómero). No presente estudo, dos 78,3% de casos invasores trissómicos para o gene *c-erbB2*, 94,4% tinham também trissomia do cromossoma 17.

A amplificação do gene *c-erbB2* apenas ocorreu em casos invasores e neste subgrupo a taxa foi de 21,7%, sendo superior à referida pelo grupo de Otha (9%) [15]. Sauter e colaboradores [20] também encontraram uma taxa mais elevada de amplificação do *c-erbB2* nos tumores invasores (14%). Miyamoto e colaboradores [41] utilizando PCR, observaram amplificação do gene *c-erbB2* em 32% dos tumores da bexiga estudados, associando-se a tumores de alto grau e avançados. No estudo presente, a taxa de expressão da proteína *c-erbB2*, foi de 30,4% nos tumores invasores e de 4,4% nos tumores superficiais. O grau de concordância entre a amplificação do gene e a expressão da proteína foi de 60%. Apenas se observou 11,1% de casos (7/63) com expressão da proteína *c-erbB2* no grupo sem amplificação. Situação diferente foi observada nos estudos de FISH e expressão da proteína no carcinoma da mama, em que a taxa de concordância entre a expressão da proteína e a amplificação foi de 95,6% mas, em 27,2% dos casos sem amplificação existia expressão da proteína [23]. Sauter e colaboradores [20] verificaram, em carcinomas uroteliais, um grau de concordância entre a amplificação do gene e a expressão da proteína de 100%, no entanto também detectaram casos sem amplificação mas com expressão da proteína. Estes resultados, aliados à observação de Jimenez e colaboradores [17], na qual se verifica existir concordância na expressão da proteína entre o tumor primário e a metástase de

carcinomas uroteliais da bexiga, sugerem que a utilização de anticorpos monoclonais na terapêutica destes tumores pode ser útil. Nesse sentido, um estudo de fase I e um de fase II de terapêutica com o Trastuzumab (Herceptin), associados à interleucina-12 e à quimioterapia, respectivamente, estão ser conduzidos, mas os seus resultados não são ainda conhecidos [42, 43].

3.5- CONCLUSÕES

A monossomia do gene TP53 é prevalente nos carcinomas superficiais papilares. Assim, a carcinogénese vesical, numa percentagem significativa de casos, parece ser o resultado de alterações genéticas que incluem a monossomia deste gene com perda de função do alelo restante. Não está ainda estabelecido qual o significado prognóstico destas alterações. A expressão da proteína p53 é monótona nos carcinomas uroteliais da bexiga, ocorrendo precoce e independentemente das alterações numéricas do gene TP53. As razões desta expressão são multifactorias e deverão ser alvo de estudo.

A taxa de proliferação não está dependente da acumulação nuclear da proteína p53 e/ou amplificação do gene *c-erbB2*. Há outros mecanismos envolvidos na indução da proliferação.

Os tumores invasores apresentam um aumento do número de cópias dos genes TP53 e *c-erbB2*, com um correspondente aumento de cópias do cromossoma 17, contudo, também se verifica amplificação do gene *c-erbB2* em cerca de 25% dos casos. A avaliação das alterações do gene *c-erbB2* e/ou da sua proteína poderá ter implicações terapêuticas. Dado não haver total concordância entre a avaliação da amplificação e a expressão da proteína *c-erbB2*, a técnica de FISH pela sua especificidade e fiabilidade, é um elemento importante na avaliação da amplificação deste gene.

3.6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Zlotta A., Noel J., Fayt I., Drowart A., Vooren J., Huygen K., Simon J., Schulman C. Correlation and prognostic significance of p53, p21 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with Bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol.* 161: 792-798. 1999.
- 2- Rabbani F., Cordo-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators and their impact on superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 27: 83-102. 2000.
- 3- Rosell R., Abad A., Monzo M., Molina F. *Oncologia Médica.* Ediciones Ergon. Madrid. pp 5-7. 1995.
- 4- Tokino T., Nakamura Y. The role of p53-target genes in human cancer. *Oncol. Hematol.* 33: 1-6. 2000.
- 5- Qureshi K., Lunec J., Neal D. Molecular biological changes in bladder cancer. *Cancer Surveys – Bladder Cancer.* 31: 77- 97. 1998.
- 6- Ferreira C., Tolis C., Giaccone G. p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol.* 10: 1011-1021. 1999.
- 7- Velculescu V., El-Deiry W. Biological and clinical importance of the p53 tumour suppressor gene. *Clin Chem.* 42: 858-868. 1996.
- 8- Sidransky D., Frost P., Von Eschenbach A., Oyasu R., Preisinger A., Vogelstein B. Clonal origin bladder cancer. *N Engl J Med.* 326: 737-740. 1992.
- 9- Schmitz-Dräger B., Goebell P., Ebert T., Fradet Y. p53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer. Playground for urologic scientists? *Eur Urol.* 38: 691-700. 2000.

- 10- Lipponen P. Over-expression of p53 nuclear oncoprotein in transitional cell bladder cancer and its prognostic value. *Int J Cancer*. 53: 365-70. 1993.
- 11- Esrig D., Elmanjian D., Groshen S., Freeman J., Stein J., Chen SC., Nichols P., Skinner D., Jones P., Cote R. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*. 331: 1259-1264. 1994.
- 12- Sarkis, A., Dalbagni, G., Cordon-Cardo, C. Melamed J., Zhang ZF., Sheinfeld J., Fair W., Herr H., Reuter V. Association of p53 nuclear over-expression and tumour progression in carcinoma *in situ* of the bladder. *J Urol*. 152: 388-92. 1994.
- 13- Gao J., Uchida T., Wang C., Jiang S., Matsumoto K., Satoh T., Minei S., Soh S., Kameya T., Baba S. Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Oncol*. 16: 469-475. 2000.
- 14- Slamon D., Godolphin W., Jones L., Holt J., Wong S., Keith D., Levin W., Stuart S., Udove J., Ullrich A., Press M. Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 244: 707-712. 1989.
- 15- Ohta J., Miyoshi Y., Uemura H., Fujinami K., Mikata K., Hosaka M., Tokita Y., Kubota Y. Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-erbB-2 gene amplification and chromosomal anomalies in bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 7: 2463-2467. 2001.
- 16- Thor A. Are patterns of HER-2/neu amplification and expression among primary tumors and regional metastases indicative of those in distant metastases and predictive of Herceptin response? *J Nat Cancer Inst*. 93: 1120-1121. 2001.
- 17- Jimenez R., Hussain M., Bianco Jr F., Vaishampayan U., Tabazcka P., Sakr W., Pontes J., Wood Jr D., Grignon D. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res*. 7: 2440-2447. 2001.

- 18- Knowles M. Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. *Cancer Surveys - Bladder Cancer*. 31: 49-81. 1998.
- 19- Lipponen P. Interrelationship between expression of p53, proliferating cell nuclear antigen and *c-erbB2* in bladder cancer. *Pathobiol*. 61: 178-182. 1993.
- 20- Sauter G., Moch H., Moore D., Carrol P., Kerschmann R., Chew K., Mihatsch M., Gudat F., Waldman F. Heterogeneity of *erbB2* gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res*. 53: 2199-2203. 1993.
- 21- Lipponen P. Expression of *c-erbB2* oncoprotein in transitional cell bladder cancer. *Eu J Cancer*. 29A: 749-753. 1993.
- 22- Coombs L., Oliver S., Sweeney E., Knowles M. Immunocytochemical localization of the *c-erbB2* protein in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Pathol*. 169: 35-42. 1993.
- 23- Mass R., Sanders C., Charlene K et al. The concordance between the clinical trials assay (CTA) and fluorescence in situ hybridization (FISH) in the Herceptin pivotal trials. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 19: 75a. 2000. (abstract 291)
- 24- Stein J., Grossfeld G., Ginsberg D., Esrig D., Freeman J., Figueroa A., Skinner D., Cote R. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of literature. *J Urol*. 160: 645-649. 1998.
- 25- Zlotta A., Schulman C. Biological markers in superficial bladder tumors and their prognostic significance. *Urol Clin North Am*. 27: 179-189. 2000.
- 26- Oosterhuis J., Schapers R., Janssen-Heijnen M., Smeets A., Pauwels R. MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder – clinical significance and comparison with other prognostic factors. *Cancer*. 88: 2598-2605. 2000.

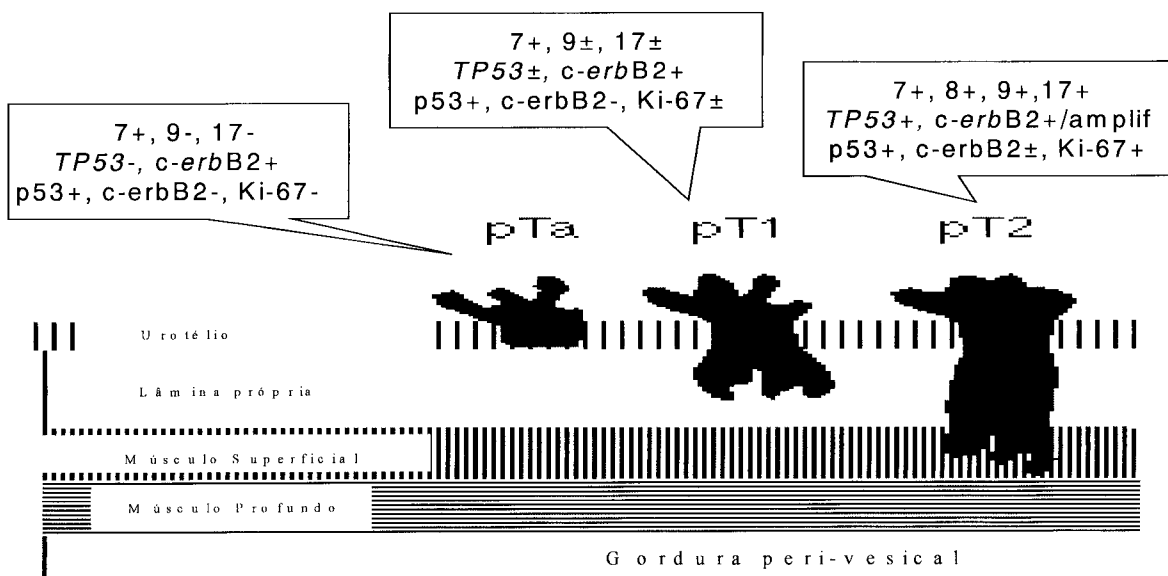
- 27- Moch H., Sauter G., Mihatsch M., Gudat F., Epper R., Waldman F. p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Hum Pathol.* 25: 1346-1351. 1994.
- 28- Asakura T., Takano Y., Iki M., Suwa Y., Noguchi S., Kubota Y., Masuda M. Prognostic value of Ki-67 for recurrence and progression of superficial bladder cancer. *J Urol.* 158: 385-388. 1997.
- 29- Santos L., Amaro T., Lopes P., Koch M., Pereira S., Lameiras C., Bento MJ., Carvalho R., Lopes C. O valor da imunoexpressão da p53, do Ki-67 e do antígeno tumoral reconhecido pelo anticorpo BL2-10D1 no prognóstico do carcinoma transicional papilar e de baixo grau da bexiga. *Uro.* 5: 30-36. 2000.
- 30- Hall P., Lane D. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? – Revisited! *J Pathol.* 172: 1-4. 1994.
- 31- Gontero P., Casetta G., Zitella A., Ballario R., Pacchioni D., Magnani C., Muir G., Tizzani A. Evaluation of p53 protein overexpression, Ki-67 proliferative activity and mitotic index as markers of tumour recurrence in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol.* 38: 287-296. 2000.
- 32- Matsuyama H., Pan Y., May E., Malmström PU., Hedrum A., Uhlen M., Busch C., Hirano T., Auer G., Tribukait B., Naito K., Lichter P., Ekman P., Bergerheim U. p53 deletion as a genetic marker in urothelial tumor by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 54: 6057-6060. 1994.
- 33- Reznikoff C., Belair C., Yeager T., Savelieva E., Blelloch R., Puthenveettil J., Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Seminars Oncol.* 23: 571-584. 1996.
- 34- Spruck III C., Ohneseit P., Zulueta M., Esrig D., Miyao N., Tsai Y., Lerner S., Schmütte C., Yang A., Cote R., Dubeau L., Nichols P., Hermann G., Steven K., Horn T., Skinner D., Jones P. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 54: 784-788. 1994.

- 35- Presti Jr J., Reuter V., Galan T., Fair W., Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.* 51: 5405-5409. 1991.
- 36- Pycha A., Mian C., Haitel A., Hofbauer J., Wiener H., Marberger M. Fluorescence in situ hybridization identifies more aggressive types of primarily noninvasive (stage pTa) bladder cancer. *J Urol.* 157: 2116-2119. 1997.
- 37- Prat E., Bernués M., Caballin M., Egoscue J., Gelabert A., Miró R. Detection of chromosomal imbalances in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. *Urol.* 57: 986-992. 2001.
- 38- Hartmann A., Rösner U., Schlake G., Dietmaier W., Zaak D., Hofstaedter F., Knuechel R. Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest.* 80: 709-718. 2000.
- 39- Knudson Jr A. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res.* 45: 1437-1443. 1985.
- 40- Nakai H., Misawa S., Toguchida J., Yandell D., Ishizaki K. Frequent p53 gene mutations in blast crisis of chronic myelogenous leukemia, especially in myeloid crisis harboring loss of a chromosome 17p. *Cancer Res.* 52: 6588-6593. 1992.
- 41- Miyamoto H., Kubota Y., Nogushi S., Takase K., Matsuzaki J., Moriyama M., Takebayashi S., Kitamura H., Hasaka M. *c-ERBB-2* gene amplification as a prognostic marker in human bladder cancer. *Urol.* 55: 679-683. 2000.
- 42- Phase I study of interleukin-12 and Trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu overexpressing malignancies. NCI-T99-0032, National Cancer Institute. <http://cancernet.nci.nih.gov>

43- Phase II of Trastuzumab (Herceptin), Paclitaxel, Carboplatin, and Gemcitabine in patients with HER2 overexpression, locally recurrent or metastatic urothelial carcinoma. NCI-198, National Cancer Institute. <http://cancernet.nci.nih.gov>

4- CONCLUSÕES GLOBAIS

- 1- A monossomia dos cromossomas 9 e 17, e a trissomia do cromossoma 7 são alterações precoces no processo de carcinogénese vesical.
- 2- A monossomia do gene TP53 é prevalente nos tumores superficiais da bexiga e está associada à acumulação nuclear da proteína p53, sugerindo um mecanismo de inativação do gene que se processa em duas etapas sucessivas: a deleção de um alelo e a mutação do restante.
- 3- Todos os carcinomas invasores apresentam alterações dos cromossomas estudados, sendo a maior parte delas o ganho de cópias de mais do que um cromossoma. Este resultado permite afirmar que a invasão da parede do órgão pelo tumor e a perda de diferenciação se associam à poliploidização tumoral. Desta forma, a instabilidade genómica parece ser um factor importante no processo de progressão vesical.
- 4- A existência de amplificação do gene *c-erbB2* nos tumores uroteliais invasores da bexiga, estratifica um subgrupo de doentes que poderá beneficiar de terapêutica com anticorpos monoclonais anti *c-erbB2*, à semelhança do que já acontece com os carcinomas da mama.



5- ESTUDOS FUTUROS

- 1- Estudar, por FISH, os genes localizados nos braços curto e longo do cromossoma 9 (9p21 e 9q32-33, respectivamente).
- 2- Estudar o significado prognóstico das alterações do cromossoma 17 e dos genes TP53 e *c-erbB2*.
- 3- Avaliar a resposta à terapêutica com anticorpos monoclonais (Herceptin) em função da amplificação do gene *c-erbB2*, detectada por FISH, e da expressão da proteína *c-erbB2*, detectada por imunohistoquímica.

6- AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Begoña Criado, que se disponibilizou para orientar o presente trabalho e me ensinou a técnica de FISH;

Ao Dr. Lúcio, que me propôs este tema, ensinou muito do que sei sobre a carcinogénese da bexiga, coorientou e colaborou activamente na discussão dos resultados;

À Dra. Teresina, que reviu e classificou todos os casos estudados;

À Paula Lopes, que se disponibilizou para a realização de todos os cortes histológicos, e da técnica de imunohistoquímica;

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes, que permitiu a utilização de um espaço no Laboratório de Anatomia Patológica, no qual foi possível realizar grande parte do trabalho prático;

Ao Dr. Guimarães dos Santos, coordenador do Mestrado em Oncologia, que permitiu que este trabalho fosse concluído no laboratório da Unidade de Cirurgia Experimental;

Ao Prof. Doutor Fernando Oliveira Torres, coordenador do Mestrado em Oncologia, que me incutiu o interesse pela investigação neste domínio;

Às colegas e amigas do laboratório, Catarina, Céu e Marta, que estiveram presentes em todos os momentos que precisei e por me terem dado opiniões preciosas para esta tese;

A todos os que trabalham nos Serviços de Anatomia Patológica e Urologia que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse possível;

Aos meus pais e irmã, e ao meu namorado, pelo carinho, apoio e compreensão;

Os meus sinceros agradecimentos

Este estudo está incluído na linha de investigação “Alterações moleculares no cancro da bexiga”, cujo investigador responsável é o Dr. Lúcio Santos, e contou com o apoio financeiro dos projectos 138/95, 83/97 e 257/99 da Comissão de Fomento para a Investigação Científica do Ministério da Saúde.