



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GUILHERME DE ALMEIDA PRADO COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO CÂNCER DE
BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO: pTa BAIXO GRAU, pTa ALTO
GRAU, pT1**

**CAMPINAS
2018**

GUILHERME DE ALMEIDA PRADO COSTA

**CARACTERIZAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO NO CÂNCER DE
BEXIGA URINÁRIA NÃO-MÚSCULO INVASIVO: pTa BAIXO GRAU, pTa ALTO
GRAU, pT1**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiopatologia Cirúrgica.

ORIENTADOR: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

Este exemplar corresponde a versão final da dissertação defendida pelo aluno Guilherme de Almeida Prado Costa e orientado pelo Professor Dr. Wagner José Fávaro.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/12047-4

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5025-2076>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C823c Costa, Guilherme Prado, 1980-
Caracterização do metabolismo energético no câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo : pTa baixo grau, pTa de alto grau, pT1 / Guilherme de Almeida Prado Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Wagner José Fávaro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Câncer da bexiga urinária. 2. Fosforilação oxidativa. 3. Glicólise. 4. Metabolismo energético. I. Fávaro, Wagner José, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of the energy metabolism in non-muscle invasive urinary bladder cancer : pTa low grade, pTa high grade, pT1

Palavras-chave em inglês:

Urinary bladder cancer

Oxidative phosphorylation

Glycolysis

Energy metabolism

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Wagner José Fávaro [Orientador]

José Carlos Souza Trindade Filho

Paulo Cesar Rodrigues Palma

Data de defesa: 10-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DO MESTRADO

GUILHERME DE ALMEIDA PRADO COSTA

Orientador: PROF. DR. WAGNER JOSÉ FÁVARO

MEMBROS:

1. PROF. DR. **WAGNER JOSÉ FÁVARO (ORIENTADOR)**
 2. PROF. DR. **JOSÉ CARLOS SOUZA TRINDADE FILHO**
 3. PROF. DR. **PAULO CESAR RODRIGUES PALMA**
-

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 10 de julho de 2018

DEDICATÓRIA:

Dedico esta tese de mestrado ao meu pai Renato Prado Costa que mais uma vez esteve ao meu lado, me dando todo tipo de suporte necessário para que eu pudesse concluir este grande desafio. Está ao meu lado em todos os momentos, tanto da vida pessoal quanto profissional. Foi com certeza a pessoa responsável por tudo que sou hoje, soube me orientar e conduzir de forma brilhante em todo meu preparo profissional.

Tenho um orgulho muito grande por ele, tanto pessoal quanto profissional. É uma pessoa fantástica, com uma bondade infinita e um coração enorme. Tem prazer em ajudar as pessoas, principalmente os mais necessitados, trabalho que faz com prazer há pelo menos quarenta anos. Profissionalmente criou o serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho na década de 70 após terminar a faculdade de medicina na Escola Paulista, a residência de cirurgia geral e urologia no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. Teve a capacidade de enxergar a necessidade de crescimento e de montar uma equipe com profissionais de altíssimo nível e caráter incontestáveis, e hoje tenho muito orgulho de fazer parte deste time.

Para demonstrar o quanto sou grato por tudo que fez e faz por mim dei seu nome ao meu filho que nasceu no dia vinte e seis de dezembro de dois mil e dezessete. A partir deste momento meu filho Renato Prado Costa Neto levará o nome de seu avô, e tenho total convicção que será motivo de imenso orgulho para ele.

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer imensamente o Professor Dr. Wagner José Fávaro, que além de ser meu orientador se tornou meu amigo nestes anos e convivência. Desde de meados de 2014 quando nos conhecemos através de meu sócio e amigo Fernando Cesar Sala, iniciamos um diálogo que tinha como objetivo a criação de trabalhos científicos, que por uma série de razões não prosperou. Até que um dia em uma conversa eu perguntei se seria possível fazer mestrado, ele aceitou e iniciamos o projeto. Deste então ele me ajudou em tudo que precisei, foi um grande parceiro e um excelente orientador. Desde já meu muito obrigado ao Professor Wagner por fazer parte deste enorme desafio em minha carreira profissional, sem ele não seria possível atingir este objetivo.

Aproveito também para agradecer a Dra. Petra Karla Böckelmann, pois me ajudou muito na execução das etapas cruciais de meu trabalho. Devido a ela foi possível realizar os testes laboratoriais necessários para obter os resultados. Em minhas vindas ao Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (LCURGIM) foi muito paciente em passar seus conhecimentos, e me deu muitas ideias importantes. Agradeço também meus amigos e colegas de trabalho Carlos Hermann Schaal, Fernando Cesar Sala e André Pereira Vanni que me deram todo apoio para a realização deste enorme desafio profissional e pessoal. Durante os numerosos períodos de ausência no trabalho eles me deram toda a cobertura necessária.

Finalmente agradeço minha esposa Mayra de Marchi Crepaldi Prado Costa pela compreensão e apoio em todos estes momentos. Me deu força e me ajudou a superar todos os obstáculos durante esta jornada. É uma parceira que está sempre ao meu lado pronta para lutar diante das dificuldades.

RESUMO:

Introdução: O carcinoma de bexiga é a segunda neoplasia mais comum do trato urinário, e é mais frequente em homens idosos. Estudos referente ao metabolismo energético vem sendo realizado nos últimos anos com o objetivo de entender os recursos que as células tumorais tem para geração de energia. As células neoplásicas enfrentam dois grandes desafios: atender as demandas bioenergéticas e biossintéticas do crescimento e proliferação celulares aumentados, e empreender estratégias de adaptação metabólica para sobreviver a flutuações ambientais de disponibilidade de nutrientes e oxigênio quando o crescimento tumoral ultrapassa a capacidade de abastecimento da vascularização existente. Esses fatos tornaram o estudo da associação do câncer e bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) com o metabolismo energético de especial relevância. **Objetivos:** Caracterizar e comparar o perfil do metabolismo energético celular nos diferentes graus histológicos (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1) do CBNMI, bem como determinar o índice bioenergético (IBEC) desta neoplasia. **Material e Métodos:** Foram utilizadas 15 amostras de tecido da bexiga urinária de pacientes com o diagnóstico de câncer de bexiga e divididos em 3 grupos de 5 pacientes: Grupo Não-Músculo Invasivo pTa baixo grau; Grupo Não-Músculo Invasivo pTa alto grau e Grupo Não-Músculo Invasivo pT1. A seguir, as amostras foram submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímicas e Western Blotting (WB). **Resultados:** O grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentou intensa imunorreatividade para β -F1-ATPase, HADHSC, PDH e CS. Demonstrou também altos níveis proteicos para β -F1-ATPase, HADHSC, PDH e AMPK, porém não teve diferença significativa em relação entre os grupos para proteína CS. Os grupos do pTa de alto grau e pT1 apresentaram intensa a moderada imunorreatividade para GLUT 1 e GAPDH respectivamente, já para as proteínas PFK e LDH ambos apresentaram intensa imunorreatividade. Demonstraram também altos níveis proteicos para GLUT 1, GAPDH e PFK, porém o grupo pT1 apresentou maiores níveis proteicos para LDH em relação aos demais. Em relação ao IBEC os pTa de baixo grau apresentaram alto IBEC e relação aos pTa de alto grau e pT1. Não houve diferença na imunorreatividade e nos níveis proteicos entre os grupos para proteína hsp60. **Conclusão:** O presente estudo possibilitou caracterizar e comparar o perfil do metabolismo energético celular nos

diferentes graus histológicos do carcinoma urotelial de bexiga não músculo invasivo (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1). Também proporcionou a adaptação do IBEC para estes tumores, fato inédito até o momento.

PALAVRAS CHAVE: Câncer de bexiga urinária; Fosforilação oxidativa; Glicólise; Metabolismo energético.

ABSTRACT

The bladder carcinoma is the second most common neoplasm urinary tract, they occur more in elderly patients, is more frequent in men. The understanding of how the neoplastic cells are capable of ensuring a positive energy balance and associate it with the anabolic processes is vital for the development of efficient therapies in combating cancer. The neoplastic cells face two major challenges: fulfill the bioenergetic and biosynthetic demands of growth and increased cell proliferation, and undertake strategies of metabolic adaptation to survive the environmental fluctuations of availability of nutrients and oxygen when the tumor growth exceeds the capacity to supply the existing vascularization. These facts became the study of the association of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) with the energy metabolism of particular relevance. **Objectives:** Characterize and compare the profile of cellular energy metabolism in different histological grades (pTa low grade, pTa high grade, pT1) of NMIBC, as well as determine the bioenergetic index (IBEC) of this neoplasm. **Material and methods:** Fifteen tissue samples of the urinary bladder of patients with the diagnosis of urothelial lesions were used. Patients with bladder tumor were divided into 3 groups of 5 patients: Non-muscle invasive group pTa low degree; non-muscle invasive pTa high degree and non-muscle invasive pT1. Then, the samples were subjected to histopathological, immunohistochemical analysis and Western Blotting (WB). **Results:** The low degree pTa carcinomas showed an avidity through oxidative phosphorylation pathway, demonstrated by a high IBEC, while the high-grade tumors (pTa high degree and pT1) had a predominance of glycolytic pathway, confirmed by low IBEC. It was also observed a decrease in the activity of AMPk in high-grade tumors in relation to those of low degree. **Conclusion:** Thus, the present study enabled the creation of IBEC for non-muscle invasive bladder tumors. Thus, it is possible to use IBEC as one more tool in driving these cases, once the treatments are aggressive and often mutilating.

KEYWORDS: Urinary bladder cancer; oxidative phosphorylation; glycolysis; energy metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Estadiamento Tumoral (30).....20
- Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo energético celular, destacando as enzimas avaliadas nesse trabalho.28
- Figura 3. 3A – 3F:** Fotomicrografias das bexigas urinárias dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau (**Figuras A, B**), Carcinoma pTa de alto grau (**Figuras C e D**) e Carcinoma pT1 (**Figuras E e F**). (**A**), (**B**) Extensas lesões papilíferas com células uroteliais em arranjo desordenado, perda da polaridade e atipias celulares. (**C**), (**D**) Acentuado pleomorfismo celular, atipias celulares marcantes (**estrela**) e numerosas figuras de mitose. (**E**), (**F**) Rompimento da membrana basal (**asterisco**) com invasão de células uroteliais neoplásicas dispostas em cordões (**triângulo**) na lâmina própria. **Ur** – urotélio, **V** – vaso sanguíneo, **seta branca** – eixo conjuntivo-vascular, **seta preta** – integridade da membrana basal, **estrela** – atipia celular, **triângulo** – cordões celulares, **asterisco** – rompimento de membrana basal. Escala (**Figuras A, C e E**): 100µm; escala (**Figuras B, D e F**): 50µm.36
- Figura 4. Figura 4A– 4L: Imunohistoquímica das bexigas urinárias dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau (Figuras A, D, G e J), Carcinoma pTa de alto grau (Figuras B, E, H e K) e Carcinoma pT1 (Figuras C, F, I e L). Imunorreatividade citoplasmática para os níveis proteicos de β -F1-ATPase (Figuras A, B e C), HADHSC (Figuras D, E e F), PDH (Figuras G, H e I) e CS (Figuras J, K e L) das células uroteliais. Ur – urotélio, Lp – lâmina própria, seta branca – eixo conjuntivo-vascular, seta preta – integridade da membrana basal, estrela – atipia celular, triângulo – cordões celulares. Contra coloração com Hematoxilina de Harris, escala: 50 µm.38
- Figura 5. Figura 5A – 5D: *Western Blotting* representativo e determinação semi-quantitativa para os níveis proteicos de β -F1-ATPase (A), HADHSC (B), PDH (C) e CS (D). As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de β -F1-ATPase, HADHSC, PDH e CS após a normalização com β -actina. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b, c) indicaram diferenças

significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.....39

Figura 6. Figura 6A – 6O: Imunohistoquímica das bexigas urinárias dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau (Figuras A, D, G, J e M), Carcinoma pTa de alto grau (Figuras B, E, H, K e N) e Carcinoma pT1 (Figuras C, F, I, L e O). Imunorreatividade citoplasmática para os níveis proteicos de GLUT 1 (Figuras A, B e C), PFK (Figuras D, E e F), GAPDH (Figuras G, H e I), LDH (Figuras J, K e L) e CS (Figuras M, N e O) das células uroteliais. Ur – urotélio, V – vaso sanguíneo, seta branca – eixo conjuntivo-vascular, seta preta – integridade da membrana basal, estrela – atipia celular, triângulo – cordões celulares. Contra coloração com Hematoxilina de Harris, escala: 50 μ m.....41

Figura 7. Figura 7A – 7C: Western Blotting representativo e determinação semiquantitativa para os níveis proteicos de GLUT 1 (A), PFK (B) e GAPDH (C). As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de GLUT 1, PFK e GAPDH após a normalização com β -actina. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.42

Figura 8. Figura 8A – 8B: Western Blotting representativo e determinação semiquantitativa para os níveis proteicos de LDH (A) e hsp60 (B). As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de LDH e hsp60 após a normalização com β -actina. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.....43

Figura 9. *Western Blotting* representativo e determinação semiquantitativa para os níveis proteicos de AMPk. As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de AMPk após a normalização com β -actina. Todos os dados foram expressos como

média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.....44

Figura 10. Índice Bioenergético Celular dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*.45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação TNM.....	20
Tabela 2. WHO 2016.....	21
Tabela 3. Características e demográficas da amostra	34
Tabela 4. Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcção e <i>Western Blotting</i>	34
Tabela 5. Intensidade da imunomarcção para os diferentes antígenos nas amostras de bexiga urinária dos grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina difosfato

AMP: Adenosina monofosfato

ATP: Trifosfato de adenosina

BCG: "*Bacillus Calmette-Guerin*"

BSA: Albumina soro bovino

CBNMI: Câncer de bexiga não músculo invasivo

CB: Câncer de bexiga

COX: Citocromo c oxidase

CS: Citrato sintase

C.T.E: Cadeia de Transporte de elétrons

ERO: Espécies reativos de oxigênio

FADH₂ : Dinucleotídeo de flavina e adenina

FDG: F18-Fluordesoxiglicose

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase

GMCSF: Fator estimulante de colônias de macrófagos

GLUT 1: Proteína transportadora de glicose 1

GLUT 3: Proteína transportadora de glicose 3

HADHSC: 3-Hidroxiacil-coA Desidrogenase

IBEC: Índice bioenergético celular

IFN: Interferon

HIF: Fator indutor de hipóxia

ILs: Interleucinas

LDH-A: Lactato desidrogenase A

LKB1: "*Liver Kinase B1*"

MM: Muscular da mucosa

mTOR: "*Mammalian Target of Rapamycin*"

NADH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NK: "*Natural killer*"

OAA: Oxaloacetato

OXPHOS: Fosforilação oxidativa

O₂: Oxigênio

PET-CT: *“Positron Emission Tomography – Computed Tomography”*

PFK: Fosfofruto quinase

PDH: Complexo enzimático piruvato desidrogenase

PTEN: *“Phosphatase and tensin homolog”*

Re-RTUB: Nova ressecção transuretral da bexiga após 4 a 6 semanas

RTUB: Ressecção transuretral da bexiga

TIGAR: *“TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator”*

TSC1/TSC2: *“tuberous sclerosis complex”*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

β -F1-ATPase: Subunidade β -catalítica do complexo H⁺-ATP sintase

2-DG: 2-desoxi-D-glicose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)	17
1.2. Metabolismo Energético e Câncer	21
2. JUSTIFICATIVA:	29
3. OBJETIVOS:	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Amostras Humanas e Procedimento Experimental.....	31
4.2. Análises Histopatológicas	31
4.3. Imunomarcagem dos Antígenos: GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60 e GAPDH.....	32
4.4. Extração de Proteínas e Western Blotting: GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60, GAPDH e AMPk.....	33
4.5. Determinação do Índice Bioenergético (IBEC).....	33
4.6. Análises Estatísticas	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Análises Histopatológicas	35
5.2. Imunorreatividade e níveis proteicos para proteínas da fosforilação oxidativa.....	37
5.3. Imunorreatividade e níveis proteicos para proteínas da via glicolítica	40
5.4. Análise dos níveis de AMPk.....	43
5.5. Índice Bioenergético Celular	44
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO I.....	61
ANEXO II.....	65
ANEXO III.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo (CBNMI)

Todos os órgãos do trato urogenital são sedes potenciais de tumores malignos. A incidência e o tipo variam de órgão para órgão. Alguns, como os tumores de uretra, são muito raros, porém outros, como os tumores de próstata têm uma incidência preocupante. O carcinoma de bexiga é a segunda neoplasia mais comum do trato urinário, ocorrem mais em pacientes idosos, é mais frequente em homens, com uma relação de quatro homens para uma mulher (1, 2). Representa 7% de todos os tumores e 4% de todas as mortes por câncer nos homens (2-5).

Para o ano de 2018 estimou-se 81.190 casos novos de câncer de bexiga (CB) e 17.240 mortes nos EUA (2). No Brasil sua incidência varia entre as regiões, excetuando-se os tumores de pele não melanoma é o sétimo tumor mais comum nos homens (6,43/100 mil) e o décimo quarto nas mulheres (2,63/100 mil) que vivem na Região Sudeste do país. Estima-se que no biênio 2018-2019 terão 6.690 casos novos em homens e 2.490 em mulheres em todo país (6).

O subtipo histológico mais comum é o carcinoma urotelial, representando mais de 90% dos casos (7). Ao diagnóstico aproximadamente 70% dos CB são superficiais (pTis, pTa e pT1) (Figura 1), ou seja, tumores não músculo invasivos, destes 70% são Ta, 20% T1 e 10% Tis (Tabela 1 e 2) (8-11). Em 2016 pela primeira vez a WHO (World Health Organization) comentou a subdivisão do pT1 em pT1a e pT1b, e o limite entre ambos seria a Muscular da mucosa (MM), porém ainda há controvérsia, uma vez que a MM pode não estar presente em todos os casos (12). Tumores Ta de baixo grau recorrem em 50–70% e progridem em somente 5% dos casos, diferentemente dos T1 de alto grau que recorrem em mais de 80% e progridem em 50% nos primeiros 3 anos (13, 14). O comportamento biológico dos CB de baixo e alto grau são muito distintos, alterações cromossômicas causadas por oxidação nas cadeias de DNA, oncogenes e genes supressores tumorais, geram diferenças entre eles. O CB de baixo grau tem uma tendência a ser superficial, papilífero e indolente, já o de alto grau tende a recorrer e progredir para músculo invasivo (15, 16). Outros fatores prognósticos também tem importância, como:

tamanho tumoral, multifocalidade, aspecto papilífero x séssil e presença de invasão linfovascular (17-19).

Um número significativo de fatores de risco tem sido relacionado ao desenvolvimento de CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos. O tabagismo é um dos fatores de risco mais importante, o qual é responsável direto por metade dos casos de CB em homens e por um quarto nas mulheres (20, 21). A fumaça do cigarro contém inúmeras substâncias químicas, muitas das quais são compostos genotóxicos, tais como os compostos N-nitroso e aminas aromáticas (22). A urina dos fumantes tem mostrado características mutagênicas, contendo o dobro da concentração total de aminas aromáticas quando comparada com os compostos encontrados na urina de não-fumantes (22).

O tratamento primário para o câncer de bexiga não músculo invasivo (CBNMI) baseia-se no tratamento cirúrgico através da ressecção transuretral da bexiga (RTUB), que possibilita a retirada de lesões visíveis e material para análise histopatológica, para assim determinar o estadió e o grau tumoral. Como tratamento adjuvante do CBNMI pode ser realizado a quimioterapia intravesical em até vinte e quatro horas da RTUB para evitar implante de células tumorais após o procedimento, diminuindo os índices de recorrência (23). Outra forma de tratamento adjuvante é a imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), que deve ser iniciada após quatro a seis semanas da RTUB, período necessário para haver a reepitelização da área ressecada, minimizando a disseminação de bactérias para o organismo (24). Morales et al. foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento do CBNMI com BCG (25). Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto grau, sendo considerada atualmente a modalidade terapêutica que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência e progressão do tumor. Segundo Sylvester et al. em mais de seiscentos pacientes obtiveram 68% resposta completa após BCG e 49% após administração de quimioterapia intravesical, com sobrevida livre de doença em 3.75 anos de 51% e 27% respectivamente (10).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune massiva caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical. Citocinas como TNF- α , fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF), interferon (IFN) e ILs induzem resposta de linfócitos T-helper e das células NK na bexiga (26). De acordo

com Schamhart et al. após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e granulócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de 1 ano (27). Contudo, tal resposta varia amplamente entre pacientes, e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação (27).

Ainda, Pook et al. demonstraram que células tumorais do CBNMI que internalizaram BCG apresentaram diminuição celular de EROs (espécies reativas de oxigênio). Estes mesmos autores verificaram que a combinação de BCG e o antioxidante N-acetilcisteína causou significativa redução de EROs e aumento da citotoxicidade nas células neoplásicas e sugeriram que os efeitos não-imunológicos do BCG podem determinar a resposta antitumoral (28). Na literatura, dúvidas persistem com relação aos efeitos da imunoterapia com BCG e a sinalização das enzimas antioxidantes no CBNMI.

No entanto, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais e dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até o óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (26, 29).

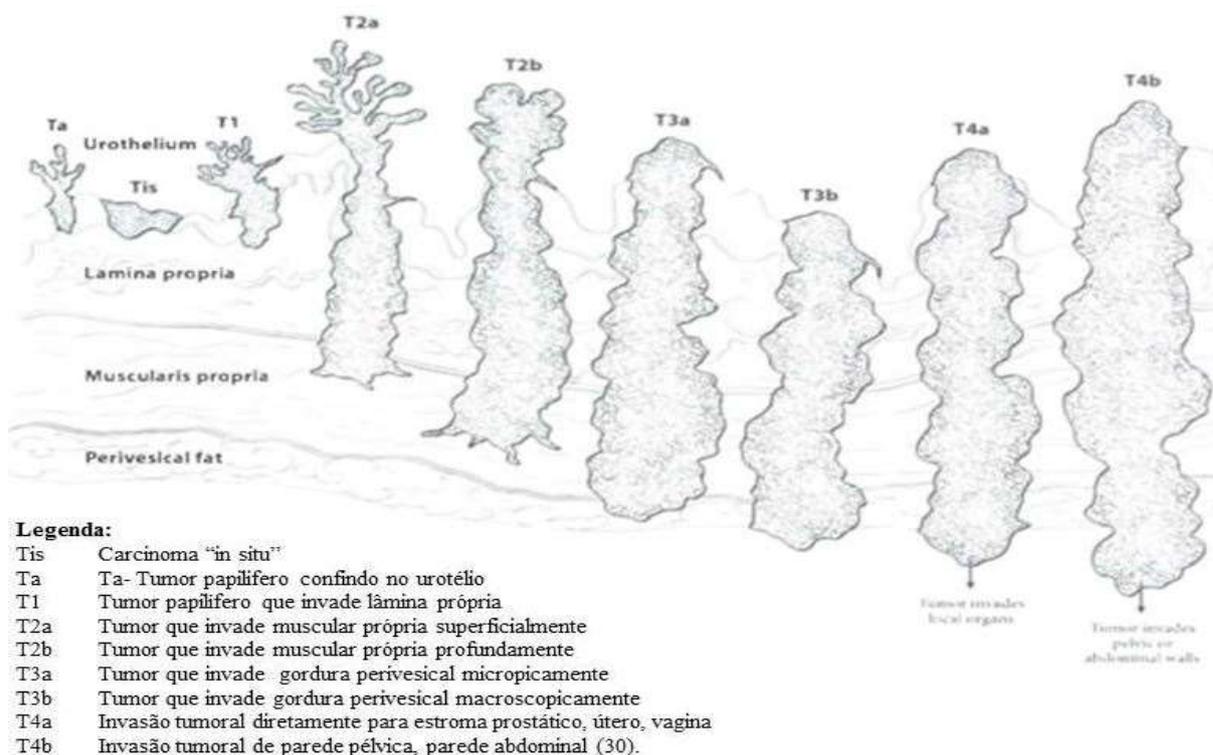


Figura 1. Estadiamento Tumoral (30)

Tabela 1. Classificação TNM

T- Tumor Primário

Tx: Tumor primário não pode ser avaliado

T0: não há evidência de tumor primário

Ta: carcinoma papilífero não invasivo

Tis: carcinoma "in situ"- tumor plano

T1: tumor invade tecido conjuntivo sub-epitelial

T2: tumor invade camada muscular

T2a: invasão da muscular superficial (metade interna)

T2b: invasão da muscular profunda (metade externa)

T3: tumor invade tecidos perivesical

T3a: invasão microscópica

T3b: invasão macroscópica (massa extra-vesical)

T4: tumor invade quaisquer dos seguintes órgãos: próstata, útero, vagina, parede abdominal, parede pélvica

T4a: invasão de próstata ou útero ou vagina

T4b: invasão de parede pélvica ou abdominal

TNM 8ª edição (30).

Tabela 2. WHO 2016**Grau tumoral WHO**

Carcinoma urotelial papilífero de baixo grau

Carcinoma urotelial papilífero de alto grau

WHO Classificação dos Tumores do Sistema Urinário e Genital Masculino (14).

1.2. Metabolismo Energético e Câncer

A proliferação celular descontrolada representa uma das principais características da doença neoplásica. Para tal, ajustes no metabolismo energético celular são necessários para estimular o crescimento e a divisão celular (31, 32). Assim, as células neoplásicas exibem um padrão metabólico muito diferente daquele encontrado nas células normais (33). As células neoplásicas são metabolicamente adaptadas para um rápido crescimento e proliferação em condições hostis, como pH ácido e baixas tensões de oxigênio; condições nas quais as células normais dificilmente conseguiriam sobreviver. Essas células parecem se adaptar ao microambiente criado, alterando seu padrão metabólico em direção ao uso de combustíveis celulares (glicose, lipídios e aminoácidos) mais rapidamente e eficientemente que as células normais (33). O consumo desses nutrientes tem basicamente dois destinos preferenciais: geração de ATP via glicólise aeróbia ou anaeróbia, fosforilação oxidativa (OXPHOS), e biossíntese de macromoléculas (DNA, lipídios de membranas e proteínas) (33).

O consumo de energia de atividades metabólicas em células normais se baseia principalmente na OXPHOS, a qual é eficiente e gera mais trifosfato de adenosina (ATP) em relação à glicólise. Em condições aeróbias, as células normais convertem a glicose primeiro a piruvato via glicólise no citosol e, posteriormente, para dióxido de carbono na mitocôndria (32). Em condições anaeróbias, a glicólise é favorecida e relativamente pouco piruvato é fornecido às mitocôndrias consumidoras de oxigênio (32). Nesta situação a glicólise fornece energia preferencialmente para o núcleo por ser o compartimento mais susceptível à deficiência de ATP, e a OXPHOS para o citoplasma (34). Esse processo se caracteriza por elevado consumo de glicose e produção de lactato, independentemente do aporte de O₂ (Oxigênio) (32, 33, 35, 36).

Contudo, uma das características metabólicas das células neoplásicas é captar avidamente a glicose para a glicólise aeróbia (4, 31, 32, 34). O cientista

alemão Otto Heinrich Warburg observou pela primeira vez uma característica anômala do metabolismo energético de algumas células neoplásicas (37, 38): mesmo na presença de oxigênio, algumas dessas células podem reprogramar seu metabolismo de glicose, e portanto sua produção de energia, restringindo seu metabolismo energético em grande parte à glicólise, levando a uma condição denominada de "glicólise aeróbia" (fenômeno conhecido como efeito Warburg) (4, 31, 32). Warburg propôs que a glicólise aeróbia em algumas células neoplásicas foi decorrente à uma incapacidade permanente de OXPHOS mitocondrial (4, 39-41). Entretanto, esse aspecto foi contestado por pesquisas recentes que descobriram que os defeitos da OXPHOS mitocondrial não são comuns nos tumores, e que a função de OXPHOS mitocondrial na maioria dos tumores está preservada (4, 31, 39-42). Saganuma et al. avaliaram o metabolismo energético de quatro linhagens celulares leucêmicas utilizando um inibidor da glicólise, 2-desoxi-D-glicose (2-DG) e um inibidor da OXPHOS, a oligomicina. Tais autores verificaram que as células NB4 foram mais sensíveis ao 2-DG em relação as outras três linhagens celulares e concluíram que, as células NB4 constituíram uma linhagem celular leucêmica "glicolítica". Alternativamente, as células THP-1 foram mais resistentes à 2-DG e sensíveis à oligomicina, sendo consideradas como uma linhagem celular sensível à "OXPHOS". Tais resultados sugerem que a via metabólica para gerar energia pode variar entre os tumores (43).

Também, Fantin et al. observaram que quando a enzima lactato desidrogenase A (LDH-A) foi suprimida em células neoplásicas, a função de OXPHOS poderia estar aumentada para compensar a diminuição de ATP decorrente da inibição da glicólise. Esta observação sugere que a maioria das células neoplásicas reserva a capacidade de produzir ATP pela OXPHOS. O fenótipo glicolítico em células neoplásicas é decorrente da supressão da OXPHOS pela glicólise ativa, ao invés de defeitos na função mitocondrial. Além disso, esses mesmos autores verificaram que a proliferação e a tumorigenicidade das células neoplásicas foram inibidas quando a atividade da LDH-A foi suprimida, principalmente em condições de hipóxia, indicando que o aumento da OXPHOS ainda não foi suficiente para cumprir as exigências metabólicas para o crescimento tumoral e que LDH-A pode constituir um alvo terapêutico (42) (Figura 2).

Considerando que a contribuição glicolítica para produção total de ATP não excede geralmente 50% - 60%, a OXPHOS ainda contribui substancialmente

para a produção de ATP nas células neoplásicas (4, 44). Determinadas linhagens celulares malignas humanas (HL60, HeLa, 143B e U937) utilizam OXPHOS para promover seu crescimento; entretanto, este fenótipo é alterado na hipóxia (45). Por exemplo, a contribuição da OXPHOS para a produção total de ATP é normalmente 79% e 91% nas células de carcinoma cervical (HeLa) e mama (MCF), respectivamente. Esta contribuição, no entanto, é reduzida para 29% devido principalmente a hipóxia (46). Moreno-Sánchez et al. verificaram que, embora a glicólise desempenhe um importante papel no metabolismo energético das células neoplásicas, uma quantidade considerável de tumores também utilizam a OXPHOS como uma via para produção de energia (47) (Figura 2).

Para que ocorra a captação de glicose para o interior celular, as células, tanto normais como neoplásicas, utilizam transportadores de membrana específicos, tais como os transportadores de glicose 1 e 3 (GLUT 1 e GLUT 3). O GLUT 1 apresenta grande distribuição tecidual e é responsável pela captação basal de glicose em muitas células normais e em grande parte das células neoplásicas (47-49) (Figura 2). Além disso, algumas enzimas intracelulares são consideradas “enzimas-reguladoras”, pois controlam pontos metabólicos, irreversíveis e que, portanto, são bons indicadores da velocidade da via. O controle da glicólise e da oxidação da glicose está associado à ativação ou inibição de algumas “enzimas-chave”. A PFK da via glicolítica é ativada quando as concentrações intracelulares de ADP, ou AMP estão elevadas, e inibida quando as concentrações de ATP estão elevadas. Lactato desidrogenase é a enzima responsável pela interconversão piruvato-lactato. Esse processo assegura à célula suprimento de ATP, mesmo em condições de baixo débito de oxigênio (hipóxia) (48) (Figura 2). Dessa maneira essa enzima é fundamental tanto para a glicólise anaeróbia como para o efeito Warburg.

O complexo PDH constitui o ponto chave para a oxidação da glicose. Sua atividade é controlada pela quantidade de substrato energético disponível na célula. A presença de elevadas concentrações de NADH e acetil-CoA produzidas pela degradação de ácidos graxos inibem a atividade do complexo PDH. Já a ativação desse complexo assegura um caminho de “mão única” do piruvato para acetil-coA e ciclo de Krebs (50) (Figura 2). Citrato sintase é a primeira enzima a atuar neste ciclo, responsável pela condensação do oxaloacetato com acetil-CoA formando citrato, a atividade dessa enzima está diretamente relacionada à rapidez com que essa via

está ocorrendo, bem como quais possíveis reguladores podem estar contribuindo (40).

Outro combustível bastante consumido pelas células (normais ou neoplásicas) são os lipídios. A oxidação de uma molécula de ácido graxo garante um suprimento maior de ATP comparado ao catabolismo da glicose. Além disso, o metabolismo celular de carboidratos e lipídios está intimamente interrelacionado (51). Uma enzima marcadora da via de oxidação dos ácidos graxos é 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase (Figura 2).

O NADH e o FADH₂, formados na glicólise, na oxidação de ácidos graxos e no ciclo de Krebs, são moléculas ricas em energia, uma vez que cada uma delas possui um par de elétrons com alto potencial de transferência. A OXPHOS é o processo no qual se forma ATP quando se transferem elétrons de NADH ou FADH₂ para O₂ por uma série de transportadores de elétrons. Uma proteína marcadora da fosforilação oxidativa é a ATPsintase, uma vez reprimida pode ajudar a limitar a atividade mitocondrial principalmente em células neoplásicas (52, 53).

Os combustíveis glicolíticos estão associados com oncogenes ativados (por exemplo RAS e MYC) e supressores tumorais mutantes (por exemplo, TP53), cujas alterações nas células neoplásicas foram selecionadas principalmente por seus benefícios em conferir recursos característicos de proliferação celular e atenuação da apoptose (32, 35, 54). Esta dependência da glicólise pode ser ainda mais acentuada nas condições de hipóxia que ocorrem no microambiente de muitos tumores: o sistema de resposta a hipóxia atua de diversas formas para supra-regular os transportadores de glicose e múltiplas enzimas da via glicolítica (32, 35, 54, 55). Assim, vários supressores tumorais, como: LKB1, PTEN, TSC1/TSC2 e a hipóxia podem aumentar de forma independente os níveis dos fatores indutores de hipóxia (HIF) 1 α e 2 α , os quais regulam positivamente a glicólise (31, 32, 55).

A proteína p53 é codificada pelo gene TP53, o qual é o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos e atua como um fator de transcrição tetramérico que induz centenas de genes alvos envolvidos na regulação da apoptose, ciclo celular e reparo do DNA (56-58). A perda ou inativação de p53 promove a glicólise e pode conduzir ao efeito Warburg por vários meios, incluindo a modulação do TIGAR (uma frutose-2,6-bifosfato que atua como regulador da apoptose e glicólise induzida por TP53), ou síntese da proteína SCO2, a qual é necessária para a correta montagem do complexo terminal da cadeia de transporte

de elétrons, a citocromo c oxidase (COX) (58-60). Além disso, p53 promove a utilização de glutamina por supra-regulação da glutaminase 2, de modo a gerar respostas antioxidantes mediadas por p53, pois a glutamina é requerida para a síntese de glutatona, um poderoso antioxidante (61).

Outra proteína que participa deste ponto de controle metabólico regulado por p53 é a proteína AMPk. Esta proteína promove a sobrevivência celular em face do estresse metabólico, promovendo a parada do ciclo celular através da infra-regulação de vias anabólicas e promoção do catabolismo (58, 62). AMPk também participa na inativação de mTOR que é um dos principais reguladores da tradução proteica e proliferação. Esta proteína, e o complexo mTORC1 que é ativado, detecta o estado nutricional das células. Caso os nutrientes estejam ausentes, as células não sintetizam proteínas e param de crescer. Contudo, quando mTOR é hiperativado, tal como num contexto oncogênico por mutação do supressor tumoral TSC, as células tornam-se susceptíveis à privação de glicose. Estas células tentam usar os nutrientes para as vias anabólicas pois elas não conseguem igualar o fornecimento e a demanda de nutrientes (58, 63). Isto indica que a perda de TSC, bem como a perda de p53, promove a letalidade sintética com bloqueio da glicólise (58, 63).

Smolková et al. propuseram quatro etapas para a regulação metabólica durante a carcinogênese (64). Etapa 1: transformação das células-tronco neoplásicas, decorrente da sinalização mediada por oncogenes; Etapa 2: hipóxia, induzindo o fator indutor de hipóxia, AMPk e a sinalização do NF- κ B. Nas etapas 1 e 2, o metabolismo energético celular favorece a glicólise e inibe a OXPHOS devido aos controles oncogênicos e hipóxicos da reprogramação genética, ou seja, fenótipo de Warburg clássico. Etapa 3: ausência de glicose e escassez de nutrientes, decorrentes da elevada taxa de proliferação durante a malignidade. Nesta etapa, a função de OXPHOS mitocondrial é parcialmente restaurada, devido à reprogramação genética através das vias LKB1-AMPK-p53 e/ou PI3K-Akt-mTOR. Etapa 4: restabelecimento das mitocôndrias; a sinalização retrógrada de mitocôndrias revitalizadas pode constituir essa etapa da reprogramação genética. Assim, a hipótese do trabalho de Smolková et al. indica que o fenótipo de Warburg não é exclusivo, e que uma diminuição da função mitocondrial não é característica geral das células neoplásicas (64).

Curiosamente, alguns tumores podem conter duas subpopulações de células neoplásicas que diferem nas suas vias de produção de energia. Uma subpopulação consiste de células dependentes de glicose que secretam lactato; enquanto que as células da segunda subpopulação utilizam o lactato produzido pelas células vizinhas como principal fonte de energia, utilizando parte do ciclo do ácido cítrico (65-67). Essas duas subpopulações evidentemente funcionam em simbiose: as células neoplásicas hipóxicas dependem da glicose como combustível e secretam lactato como produto, o qual é preferencialmente utilizado como combustível pelas células vizinhas mais oxigenadas. Assim, a cooperação entre células secretoras e células que utilizam lactato para crescimento tumoral não é considerada uma característica exclusiva dos tumores, mas reflete uma cooptação de um mecanismo fisiológico normal, neste caso um sistema funcionando no músculo (65-67). Ainda, torna-se evidente que a oxigenação, variando de normóxia à hipóxia, não constitui um mecanismo estático nos tumores, mas em vez disso varia temporal e regionalmente como resultado da instabilidade e organização caótica da neovascularização associada ao tumor (68).

As recentes técnicas genômicas e proteômicas, permitiram a análise do padrão de expressão de genes e proteínas associados com o fenótipo de um determinado tipo de tumor, proporcionando o conhecimento da assim chamada "assinatura do câncer" (69, 70). Diversos estudos relataram a assinatura metabólica do câncer em alguns tumores humanos como: mama, pulmão, colo-retal, fígado, rins e estômago (69-71). Qiu et al. identificaram uma distinta assinatura metabólica com 15 marcadores nas amostras teciduais de câncer colo-retal, os quais podem ser utilizados como indicadores do tratamento cirúrgico e quimioterapia nos pacientes com esse tipo de tumor (70). Esses mesmos autores demonstraram que as alterações metabólicas identificadas nas amostras teciduais de câncer colo-retal indicaram uma robusta adaptação metabólica para sustentar a proliferação celular. Isidoro et al. demonstraram a existência de impedimento da OXPHOS mitocondrial, atestada experimentalmente pela diminuição da expressão da H⁺-ATP sintase nas mitocôndrias desses tumores (71).

A maioria dos trabalhos que estudou o metabolismo energético mitocondrial de células neoplásicas o fizeram estudando a concentração da subunidade β -catalítica do complexo H⁺-ATP sintase como marcador da OXPHOS, e proteína de choque hsp60 como marcador da proteína estrutural mitocondrial, em

combinação com um marcador da via glicolítica, gliceraldeído-3-fosfato-dehidrogenase. O índice bioenergético celular é calculado a partir da relação β -F1-ATPase/ hsp60 dividido pelo marcador da via glicolítica (GAPDH) (52, 53, 71-73). A expressão da β -F1-ATPase e da hsp60 apresentou-se significativamente reduzida no adenocarcinoma de mama e gástrico, no carcinoma de pulmão e no carcinoma epidermóide de esôfago, sugerindo fortemente que a alteração da função bioenergética da mitocôndria participa da gênese desses tumores (52, 71, 72). A consequência metabólica do impedimento mitocondrial é o desvio de produção de ATP celular via glicólise anaeróbia. De fato, foi observado pelos mesmos autores o aumento de GAPDH nos cânceres de mama, pulmão, colo-retal, gástrico e rins (52, 71, 72). Cuezva et al. demonstraram relação entre IBEC, tamanho tumoral e sobrevida em adenocarcinoma de pulmão. Quanto menor o IBEC, ou seja maior função glicolítica em relação OXPHOS, menor a sobrevida e maior a massa tumoral (72).

Portanto, apesar da literatura demonstrar a grande heterogeneidade de alterações metabólicas nas células neoplásicas, a associação entre o metabolismo energético e os diferentes tipos de tumor parece ser um campo com perspectivas promissoras no melhor entendimento do comportamento das células neoplásicas.

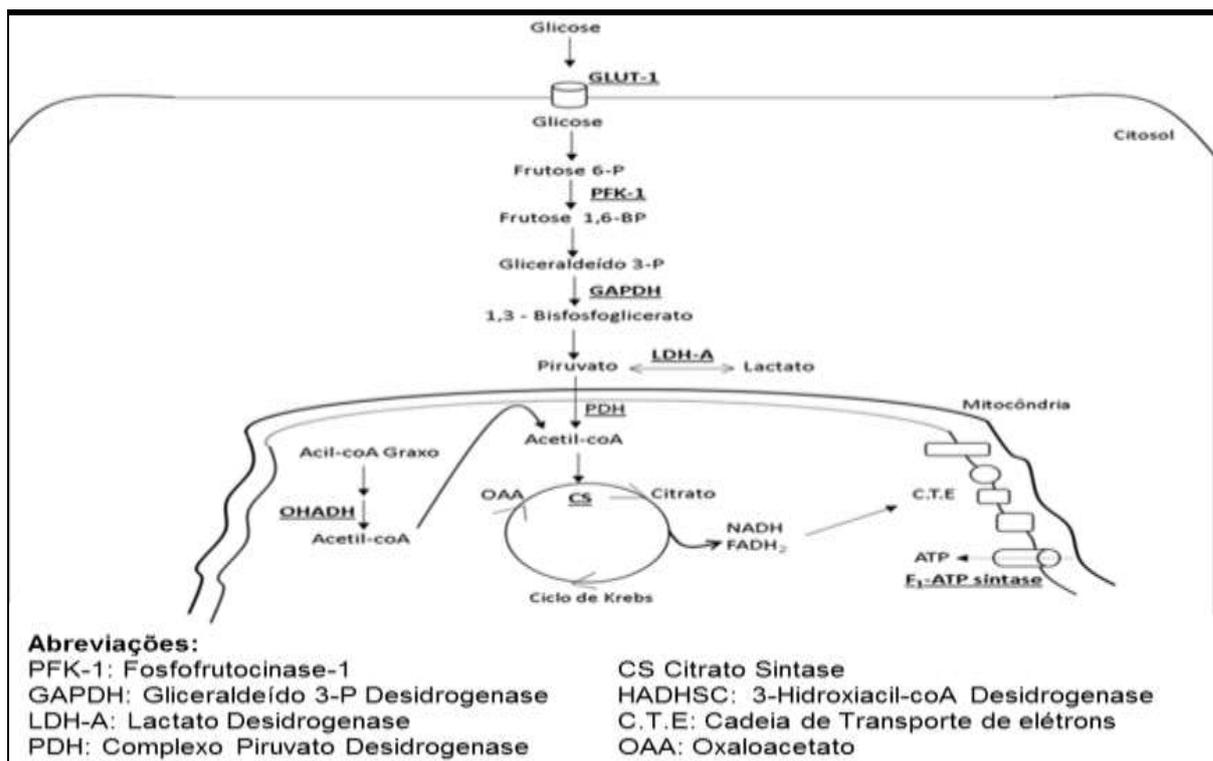


Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo energético celular, destacando as enzimas avaliadas nesse trabalho.

2. JUSTIFICATIVA:

As células neoplásicas enfrentam dois grandes desafios: como atender as demandas bioenergéticas e biossintéticas do crescimento e proliferação celular aumentados e, como empreender estratégias de adaptação metabólica para sobreviver a flutuações ambientais de disponibilidade de nutrientes e oxigênio quando o crescimento tumoral ultrapassa a capacidade de abastecimento da vascularização existente. Para suprir essas demandas, as células neoplásicas reorganizam todos os mecanismos de sinalização celular relacionados com as vias de controle de crescimento e todo o seu processo metabólico com o objetivo de aumentar as reações anabólicas necessárias para manter a viabilidade tumoral. Como todas as células neoplásicas são dependentes desta alteração metabólica, essas vias alteradas representam um importante alvo terapêutico.

O entendimento de como as células neoplásicas são capazes de assegurar um balanço energético positivo e associá-lo a processos anabólicos é vital para o desenvolvimento de terapias eficazes no combate ao câncer. O estudo do metabolismo energético visa compreender e indicar, por exemplo, qual combustível está sendo utilizado preferencialmente, de qual via está participando esse combustível, quais são os fatores que regulam ou modulam a velocidade dessas vias, entre outros.

3. OBJETIVOS:

Os objetivos gerais do presente estudo foram:

1. Caracterizar e comparar o perfil do metabolismo energético celular nos diferentes graus histológicos (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1) do CBNMI.
2. Criação do índice bioenergético celular nos diferentes graus histológicos (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1) do CBNMI.

Tais objetivos gerais foram alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

- a) Caracterização e comparação por meio de imunomarcagem o metabolismo energético [GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60, GAPDH] nas amostras de bexiga urinária com CBNMI (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1);
- b) Caracterização e comparação por meio de Western Blotting do metabolismo energético [GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60, GAPDH] e do AMPk nas amostras de bexiga urinária com CBNMI (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1).
- c) Realização do cálculo do IBEC para os diferentes graus histológicos (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1) do CBNMI.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras Humanas e Procedimento Experimental

No presente trabalho foram utilizadas 15 amostras de tecido da bexiga urinária de pacientes na faixa etária de 60 a 90 anos com o diagnóstico de lesões uroteliais, obtidas no Serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP (Tabela 3). Os pacientes foram divididos em 3 grupos: Grupo Não-Músculo Invasivo pTa baixo grau (5 amostras); Grupo Não-Músculo Invasivo pTa alto grau (5 amostras) e Grupo Não-Músculo Invasivo pT1 (5 amostras). A seguir, as amostras foram submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímicas e Western Blotting. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho e encontra-se no anexo I.

4.2. Análises Histopatológicas

Para as análises histopatológicas, amostras da bexiga urinária de todos os pacientes de cada grupo foram coletadas e fixadas em Bouin por doze horas. Após a fixação os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados com xilol por 2 horas e inclusos em polímeros plásticos (Paraplast Plus, ST. Louis, MO, EUA). Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha) com espessura de 5 micrômetros, corados com Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera Nikon DS-R1-1 (Nikon, Tóquio, Japão).

O diagnóstico das lesões uroteliais foram classificadas conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (74).

4.3. Imunomarcação dos Antígenos: GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60 e GAPDH.

Amostras da bexiga urinária de todos os pacientes dos 3 grupos, as mesmas utilizadas para as análises histopatológicas, foram utilizadas para as imunomarcações. A seguir foram obtidos cortes com 5 μ m de espessura no micrótomo rotativo Biocut 1130 (Reichert-Jung, Munique, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e β -F1-ATPase), hsp60 e GAPDH foram localizados através dos anticorpos primários específicos (Tabela 4), diluídos em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O kit MACH 4 Universal HRP-Polymer (Biocare Medical, EUA) foi usado para detecção dos antígenos de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do kit MACH 4 por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Nikon Eclipse Ni-U (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com câmera Nikon DS-RI-1 (Nikon, Tóquio, Japão).

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células uroteliais positivas foi examinada em dez campos para cada anticorpo com aumento de 400x. A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células uroteliais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células uroteliais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células uroteliais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células uroteliais positivas (Tabela 5) (75).

4.4. Extração de Proteínas e Western Blotting: GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60, GAPDH e AMPk.

Amostras da bexiga urinária de todos os pacientes dos 3 grupos foram coletadas, congeladas e posteriormente, submetidas as análises de Western Blotting. As amostras da bexiga urinária foram homogeneizadas em tampão de extração contendo, Triton-x-1%, NaCl 150mM, Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, HEPES 1mM pH 7,6, PMSF 0,2 mM e 10 μ L/mL de coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os extratos das bexigas urinárias foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14000 rpm a 4°C. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford e as leituras feitas por ELISA (Multiskan FC Photometer, Standard; Thermo Fisher Scientific, EUA). O correspondente a 70 microgramas de proteínas foi aplicado no gel de SDS-poliacrilamida. Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose. As membranas foram então bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os anticorpos primários: GLUT 1, PFK, LDH-A, PDH, CS, HADHSC e ATPsintase (β -F1-ATPase), hsp60, GAPDH, p53 e AMPk (Tabela 4). Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas com os anticorpos secundários HRP conjugados na diluição de 1:2000 em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade peroxidásica foi revelada com o substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, EUA). O anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno. O sinal quimioluminescente das bandas foi capturado pelo sistema GeneGnome5 (Syngene, Frederick, MD, EUA) e a intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi quantificada por densitometria através do programa Analysis System Model GeneGnome5 (Syngene, Frederick, MD, EUA).

4.5. Determinação do Índice Bioenergético (IBEC)

Para a determinação do IBEC, a intensidade da banda de β -F1-ATPase (pelo Western Blotting) foi dividida pela intensidade da banda hsp60 ensaiadas para a mesma amostra, e, na mesma membrana. Para calcular o IBEC, a razão acima

mencionada foi dividida pela intensidade da banda GAPDH (53, 71, 73). A análise foi realizada utilizando o teste t de Student para amostras pareadas.

4.6. Análises Estatísticas

Para os parâmetros quantificados nas análises imunohistoquímicas foram empregados o teste de proporção, sendo que para essas análises o erro tipo-I de 1% foi considerado significativo.

Para as análises estatísticas de Western Blotting foi empregado a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste Tukey post hoc com nível de significância de 1%.

Tabela 3. Características e demográficas da amostra

Pacientes (n)	pTa baixo grau	pTa alto grau	pT1
	5/15	5/15	5/15
Homem/mulher	3/2	3/2	4/1
Idade (anos) (mediana)	57	60	70
Tabagismo (sim/não)	4/1	4/1	4/1
RTU prévia (sim/não)	1/4	2/3	2/3
BCG prévia (sim/não)	0/5	0/5	1/4
Tamanho da lesão (mediana)	3.0 cm	3.0 cm	4.0 cm

Tabela 4. Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcção e *Western Blotting*.

Anticorpos Primários	Espécie hospedeira	Código	Fonte
GLUT 1	Coelho (policlonal)	ab652	<i>abcam, EUA</i>
PFK	Camundongo (monoclonal)	LS-C173559	<i>LSBio, EUA</i>
LDH-A	Camundongo (monoclonal)	Sc137243	<i>Santa Cruz, EUA</i>
PDH	Coelho (policlonal)	GTX104040	<i>GeneTex, EUA</i>
CS	Coelho (policlonal)	ab96600	<i>abcam, EUA</i>
HADHSC	Coelho (policlonal)	sc292196	<i>Santa Cruz, EUA</i>
ATP sintase (β -F1-ATPase)	Camundongo (monoclonal)	MBS190588	<i>MyBioSource, EUA</i>
hsp60	Camundongo (monoclonal)	Sc376240	<i>Santa Cruz, EUA</i>
GAPDH	Coelho (policlonal)	ab37168	<i>abcam, EUA</i>
p53	Camundongo (monoclonal)	ab26	<i>abcam, EUA</i>
AMPk	Coelho (policlonal)	ab3670	<i>abcam, EUA</i>

5. RESULTADOS

O estudo inclui 15 pacientes dividido em 3 grupos de 5 pacientes, a mediana de idade foi de 62 anos, com uma proporção de 2 homens para cada mulher. História positiva para tabaco ocorreu em 80% (12/15), presença de RTU prévia sucedeu-se em 33,3% (5/15) e BCG em somente 6,6% dos casos. Só foram incluídos no estudo os casos na qual a RTU prévia tinha o mesmo estágio e grau tumoral do que a peça analisada no estudo. Em relação ao tamanho tumoral a mediana para o pTa de baixo grau foi de 3.0 cm, do pTa de alto grau foi de 3.0 cm, e do pT1 foi de 4.0 cm (Tabela 3).

5.1. Análises Histopatológicas

As amostras das bexigas urinárias dos grupos com lesão apresentaram alterações histológicas de acordo com cada grau neoplásico.

As amostras do Grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentaram extensas lesões papilíferas (Figura 3A). As células uroteliais apresentaram arranjo desordenado, com perda da polaridade e, marcantes atipias celulares foram evidenciadas como núcleos pleomórficos com nucléolos proeminentes e grandes núcleos hipercromáticos (Figura 3B).

Já as amostras do Grupo Carcinoma pTa de alto grau apresentaram extensas lesões papilíferas caracterizadas por células uroteliais com arranjo desordenado (Figura 3C), acentuado pleomorfismo celular e numerosas figuras de mitose (Figura 3D).

Nas amostras do Grupo Carcinoma pT1 observaram-se rompimento da membrana basal com conseqüente invasão de células uroteliais neoplásicas dispostas em cordões ou ninhos na lâmina própria. As células uroteliais neoplásicas apresentaram citoplasma eosinofílico ou anfofílico e grande quantidade de núcleos hipercromáticos e numerosas figuras de mitose (Figuras 3E, F).

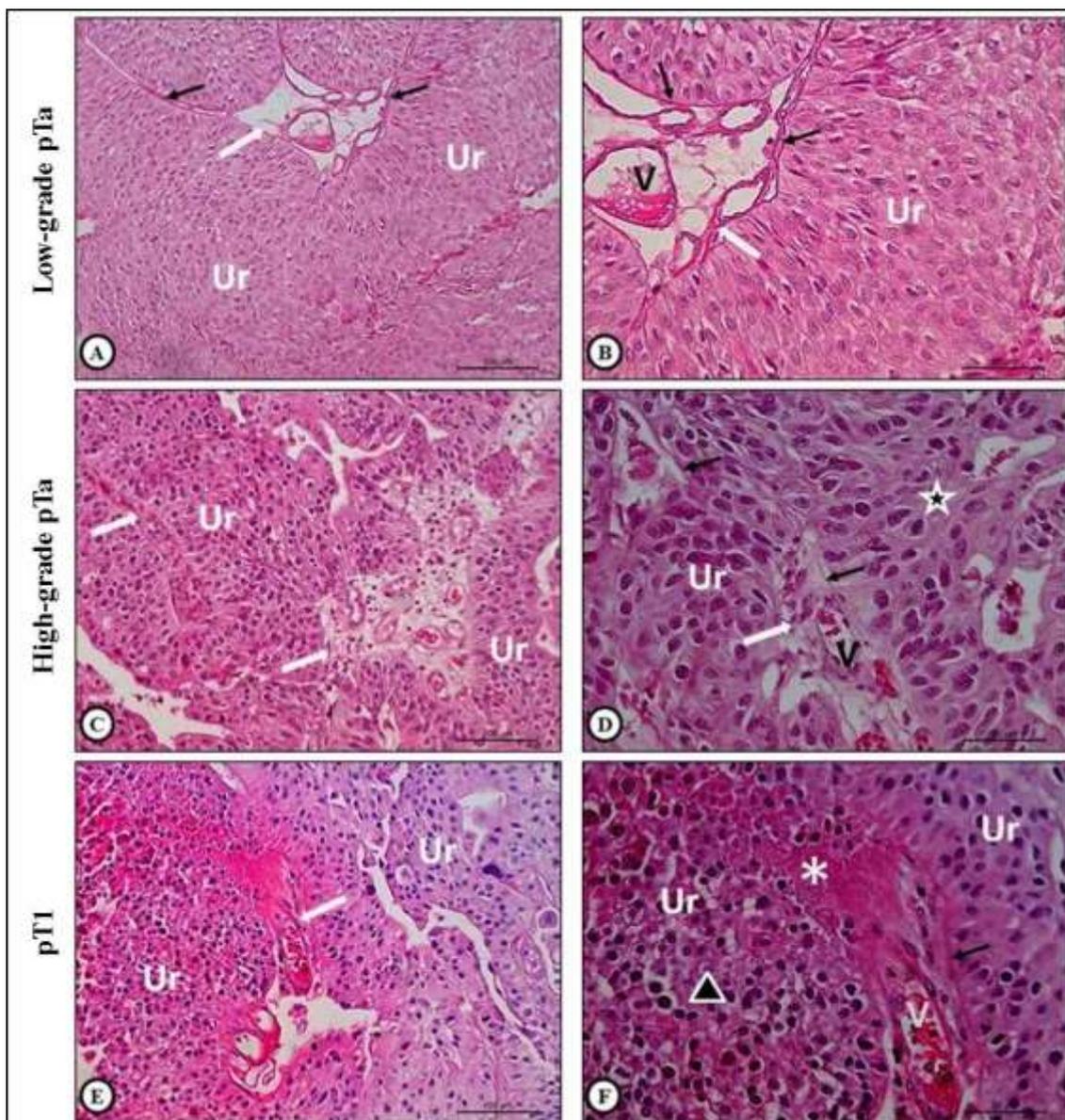


Figura 3. 3A – 3F: Fotomicrografias das bexigas urinárias dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau (**Figuras A, B**), Carcinoma pTa de alto grau (**Figuras C e D**) e Carcinoma pT1 (**Figuras E e F**). (**A**), (**B**) Extensas lesões papilíferas com células uroteliais em arranjo desordenado, perda da polaridade e atipias celulares. (**C**), (**D**) Acentuado pleomorfismo celular, atipias celulares marcantes (**estrela**) e numerosas figuras de mitose. (**E**), (**F**) Rompimento da membrana basal (**asterisco**) com invasão de células uroteliais neoplásicas dispostas em cordões (**triângulo**) na lâmina própria. **Ur** – urotélio, **V** – vaso sanguíneo, **seta branca** – eixo conjuntivo-vascular, **seta preta** – integridade da membrana basal, **estrela** – atipia celular, **triângulo** – cordões celulares, **asterisco** – rompimento de membrana basal. Escala (**Figuras A, C e E**): 100µm; escala (**Figuras B, D e F**): 50µm.

5.2. Imunorreatividade e níveis proteicos para proteínas da fosforilação oxidativa

O grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentou intensa imunorreatividade para β -F1-ATPase (Figura 4A; Tabela 5), enquanto que o grupo Carcinoma pTa de alto grau apresentou uma moderada imunorreatividade (Figura 4B; Tabela 5) e o grupo Carcinoma pT1 apresentou fraca imunorreatividade (Figura 4C; Tabela 5). Os maiores níveis proteicos para β -F1-ATPase foram encontrados no grupo Carcinoma pTa de baixo grau em relação aos demais grupos (Figura 5A).

Similarmente, a imunorreatividade para HADHSC e PDH foi intensa no grupo Carcinoma pTa de baixo grau (Figuras 4D, 4G; Tabela 5), moderada no grupo Carcinoma pTa de alto grau (Figuras 4E, 4H; Tabela 5) e fraca no grupo Carcinoma pT1 (Figuras 4F, 4I; Tabela 5). Os níveis proteicos para HADHSC e PDH foram significativamente maiores no grupo Carcinoma pTa de baixo grau em relação aos demais grupos (Figuras 5B, 5C).

O grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentou intensa imunorreatividade para CS (Figura 4J; Tabela 5), enquanto que o grupo Carcinoma pTa de alto grau apresentou uma moderada imunorreatividade (Figura 4K; Tabela 5) e o grupo Carcinoma pT1 apresentou fraca imunorreatividade (Figura 4L; Tabela 5). Não houve diferença significativa para os níveis proteicos de CS entre os grupos (Figura 5D).

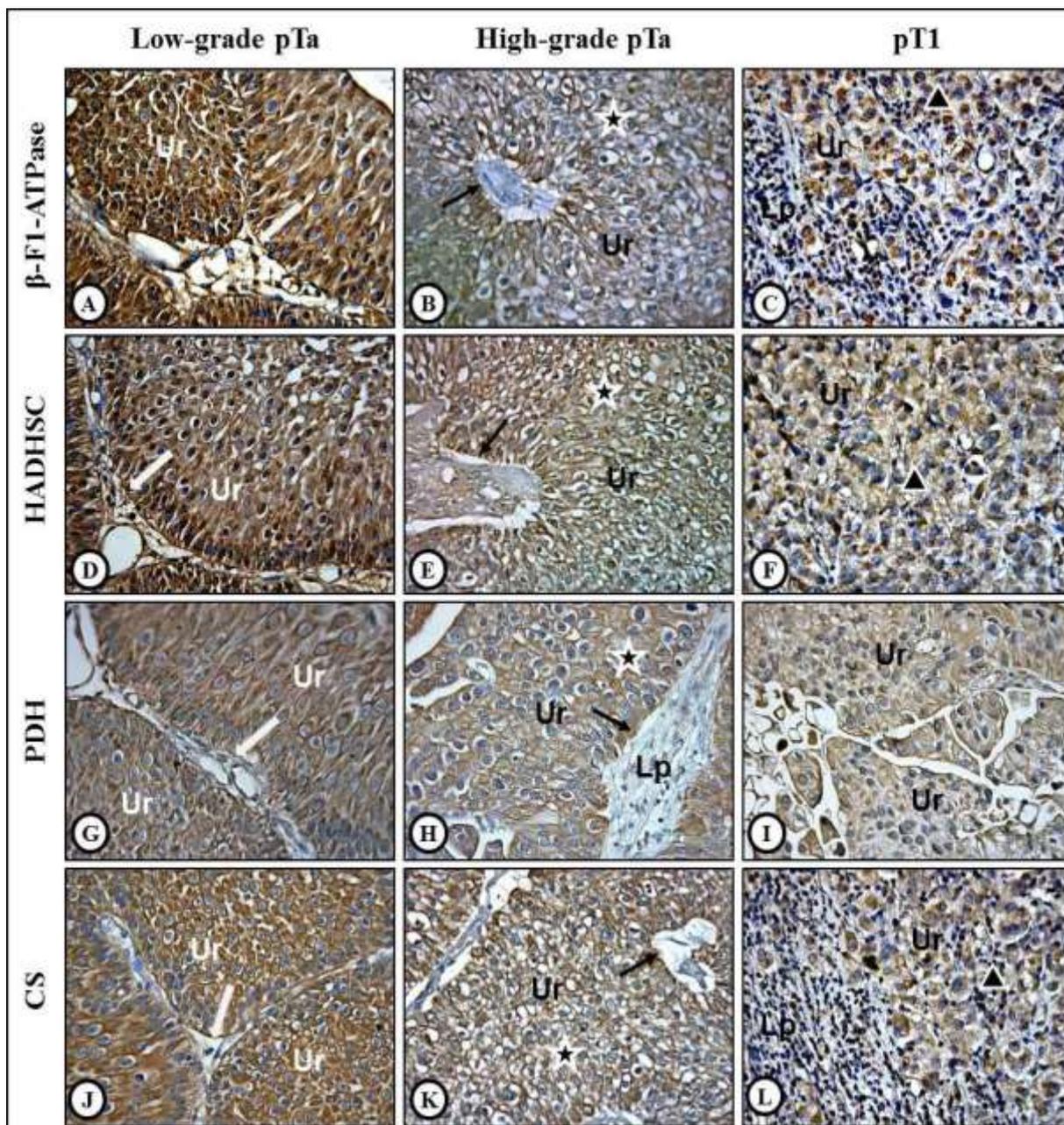


Figura 4. Figura 4A– 4L: Imunohistoquímica das bexigas urinárias dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau (Figuras A, D, G e J), Carcinoma pTa de alto grau (Figuras B, E, H e K) e Carcinoma pT1 (Figuras C, F, I e L). Imunorreatividade citoplasmática para os níveis proteicos de β -F1-ATPase (Figuras A, B e C), HADHSC (Figuras D, E e F), PDH (Figuras G, H e I) e CS (Figuras J, K e L) das células uroteliais. Ur – urotélio, Lp – lâmina própria, seta branca – eixo conjuntivo-vascular, seta preta – integridade da membrana basal, estrela – atipia celular, triângulo – cordões celulares. Contra coloração com Hematoxilina de Harris, escala: 50 μ m.

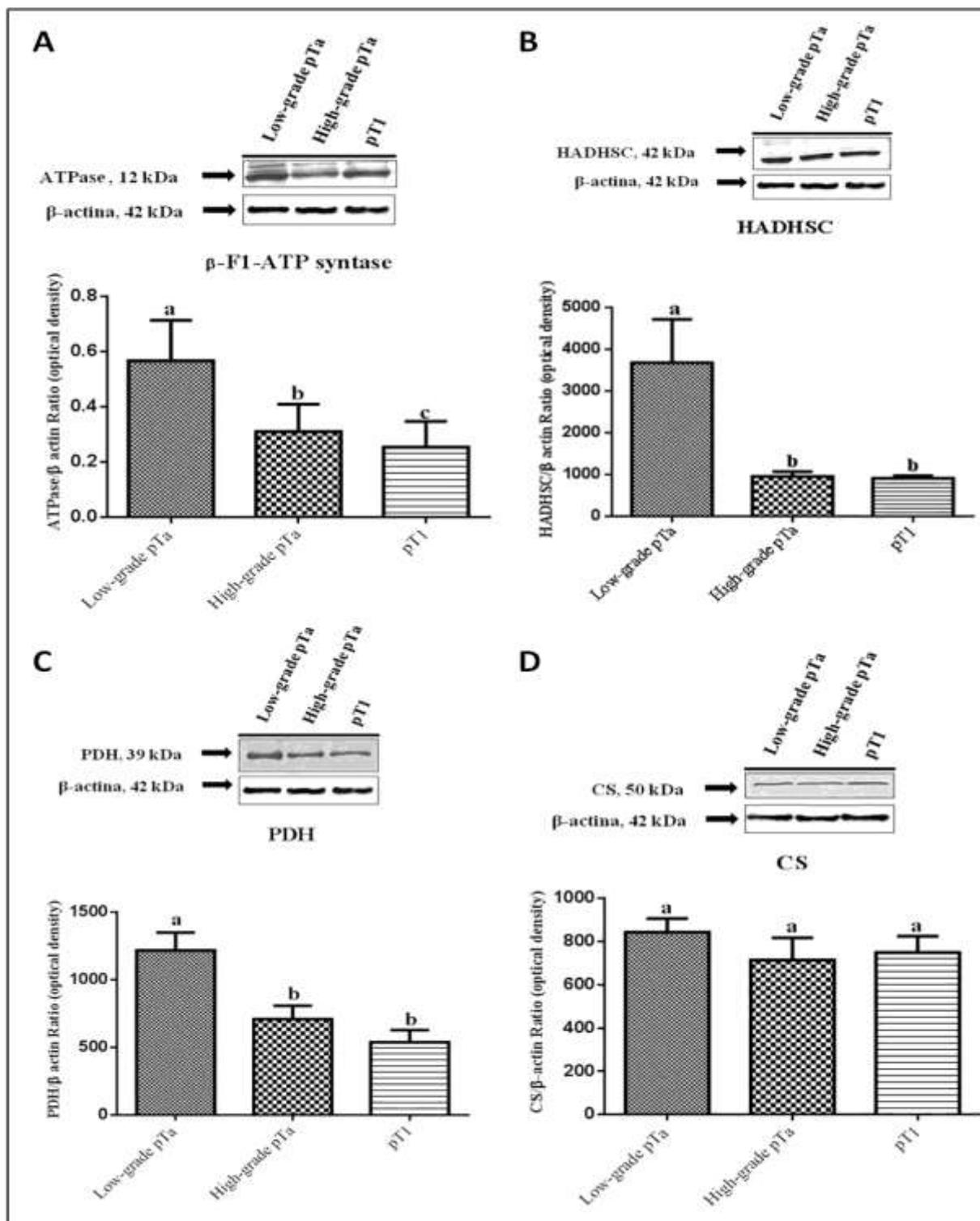


Figura 5. Figura 5A – 5D: *Western Blotting* representativo e determinação semi-quantitativa para os níveis proteicos de β-F1-ATPase (A), HADHSC (B), PDH (C) e CS (D). As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de β-F1-ATPase, HADHSC, PDH e CS após a normalização com β-actina. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b, c) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.

Tabela 5. Intensidade da imunomarcção para os diferentes antígenos nas amostras de bexiga urinária dos grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1

Antígenos	Grupos		
	pTa de baixo grau (n= 5)	pTa de alto grau (n= 5)	pT1 (n= 5)
β-F1-ATPase	3 (94,4%)*	2 (48,2%)	1 (19,6%)
HADHSC	3 (96,2%)*	2 (59,3%)	1 (22,3%)
PDH	3 (90,8%)*	2 (57,2%)	1 (23,5%)
CS	3 (92,6%)*	2 (58,0%)	1 (20,7%)
GLUT 1	1 (25,3%)	3 (82,4%)*	2 (63,0%)
PFK	1 (27,2%)	3 (90,5%)*	3 (85,2%)*
GAPDH	1 (25,9%)	3 (88,2%)*	2 (58,6%)
LDH	1 (21,9%)	3 (90,5%)*	3 (81,3%)*
hsp60	3 (87,1%)*	3 (92,0%)*	3 (86,6%)*

0, ausência de reatividade;

1, fraca imunorreatividade (1% – 35% células uroteliais positivas);

2, moderada imunorreatividade (36% – 70% células uroteliais positivas);

3, intensa imunorreatividade (> 70% células uroteliais positivas).

*Significância estatística (teste de proporção, $P < 0.0001$)

5.3. Imunorreatividade e níveis proteicos para proteínas da via glicolítica

O grupo Carcinoma pTa de alto grau apresentou intensa imunorreatividade para GLUT 1 e GAPDH (Figuras 6B, 6H; Tabela 5), enquanto que o grupo Carcinoma pT1 apresentou uma moderada imunorreatividade (Figuras 6C, 6I; Tabela 5) e o grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentou fraca imunorreatividade (Figuras 6A, 6G; Tabela 5). Os maiores níveis proteicos para GLUT 1 e GAPDH foram encontrados no grupo Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1 em relação ao grupo Carcinoma pTa de baixo grau (Figuras 7A, 7C).

Pode-se observar que houve uma intensa imunorreatividade para PFK no grupo Carcinoma pTa de alto grau e no grupo Carcinoma pT1 (Figuras 6E, 6F; Tabela 5), enquanto que o grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentou uma fraca imunorreatividade (Figura 6D; Tabela 5). Os maiores níveis proteicos para PFK foram encontrados no grupo Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1 em relação ao grupo Carcinoma pTa de baixo grau (Figura 7B).

Quanto à proteína LDH, pode-se observar que houve uma intensa imunorreatividade no grupo Carcinoma pTa de alto grau e no grupo Carcinoma pT1

(Figuras 6K, 6L; Tabela 5), enquanto que o grupo Carcinoma pTa de baixo grau apresentou uma fraca imunorreatividade (Figura 6J; Tabela 5). Os maiores níveis proteicos para LDH foram encontrados no grupo Carcinoma pT1 em relação aos demais grupos (Figura 8A).

Não pode-se observar diferença significativa na imunorreatividade e nos níveis proteicos para hsp60 entre os grupos (Figuras 6M, 6N, 6O, 8B; Tabela 5).

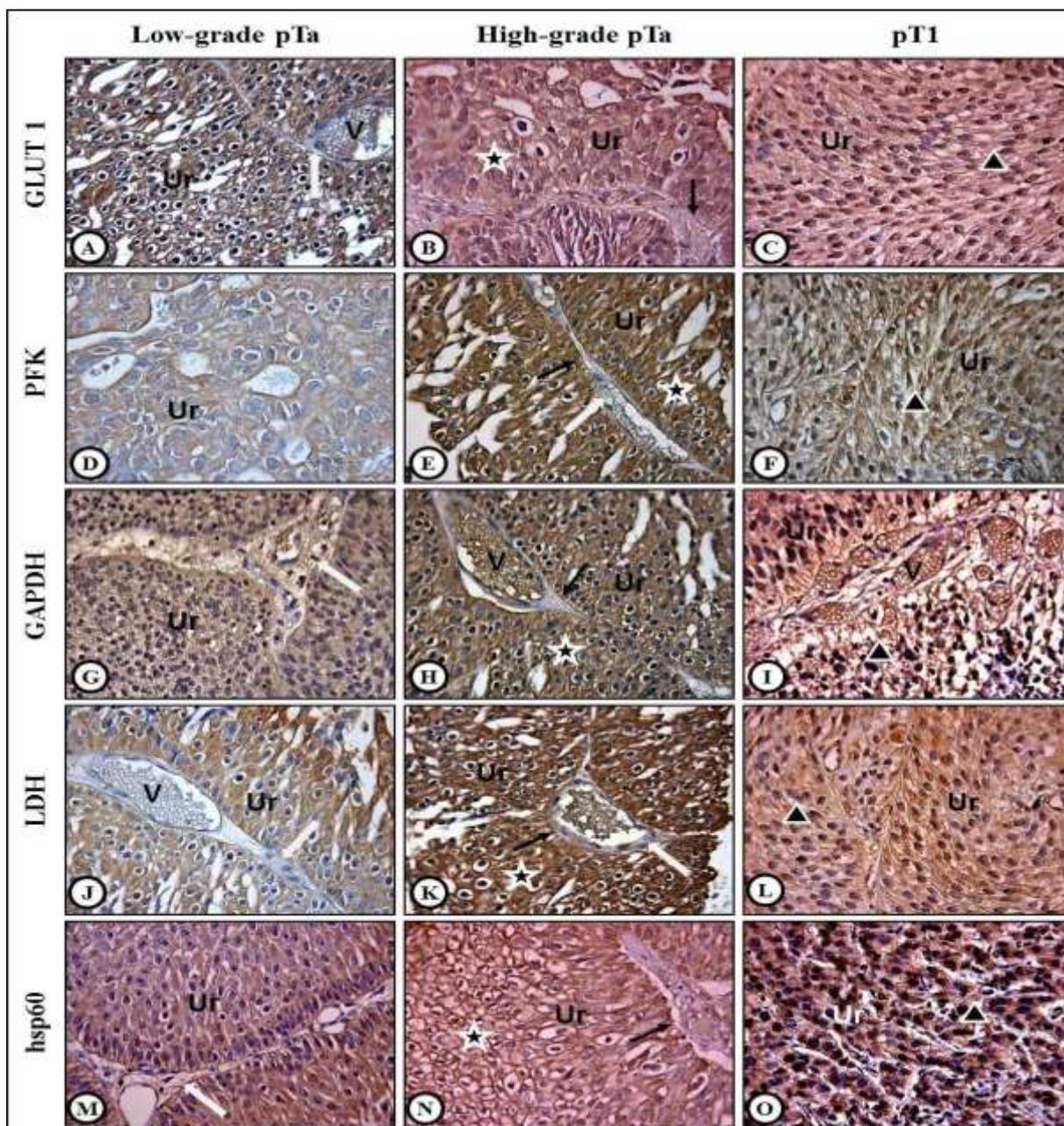


Figura 6. Figura 6A – 6O: Imunohistoquímica das bexigas urinárias dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau (Figuras A, D, G, J e M), Carcinoma pTa de alto grau (Figuras B, E, H, K e N) e Carcinoma pT1 (Figuras C, F, I, L e O). Imunorreatividade citoplasmática para os níveis proteicos de GLUT 1 (Figuras A, B e C), PFK (Figuras D, E e F), GAPDH (Figuras G, H e I), LDH (Figuras J, K e L) e CS (Figuras M, N e O) das células uroteliais. Ur – urotélio, V – vaso sanguíneo, seta branca – eixo conjuntivo-vascular, seta preta – integridade da membrana basal, estrela – atipia celular, triângulo – cordões celulares. Contra coloração com Hematoxilina de Harris, escala: 50 μ m.

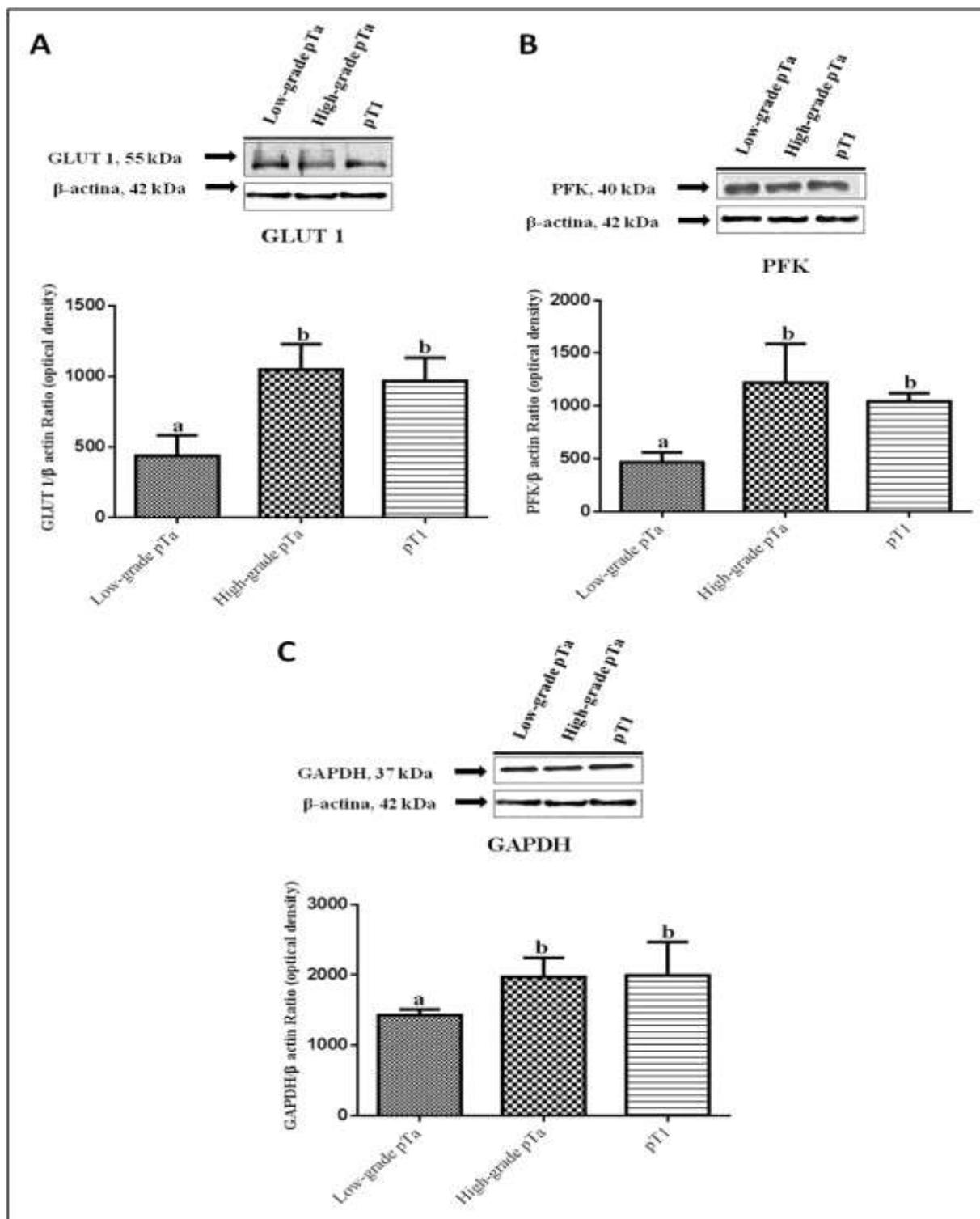


Figura 7. Figura 7A – 7C: Western Blotting representativo e determinação semiquantitativa para os níveis proteicos de GLUT 1 (A), PFK (B) e GAPDH (C). As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de GLUT 1, PFK e GAPDH após a normalização com β-actina. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de Tukey. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.

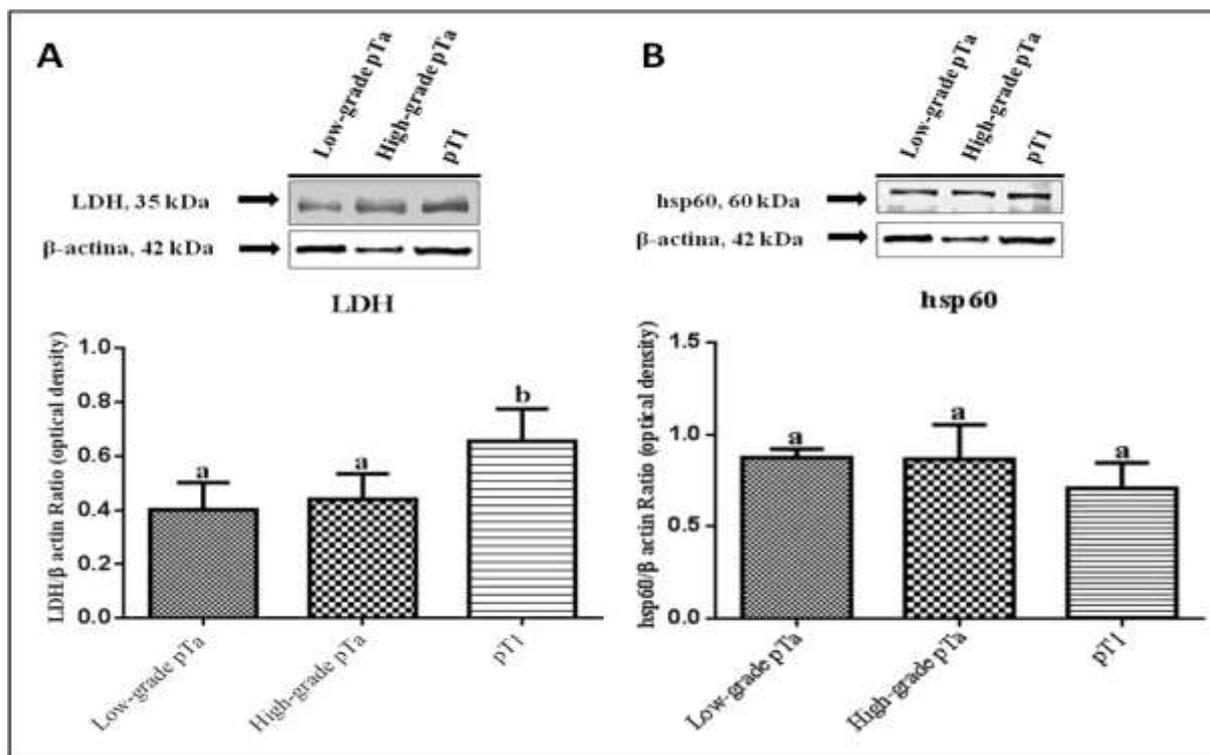


Figura 8. Figura 8A – 8B: Western Blotting representativo e determinação semiquantitativa para os níveis proteicos de LDH (A) e hsp60 (B). As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semiquantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de LDH e hsp60 após a normalização com β-actina. Todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de Tukey. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.

5.4. Análise dos níveis de AMPk

Os níveis proteicos de AMPk foram significativamente maiores no Grupo Carcinoma pTa de baixo grau em relação aos Grupos Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1 (Figura 9).

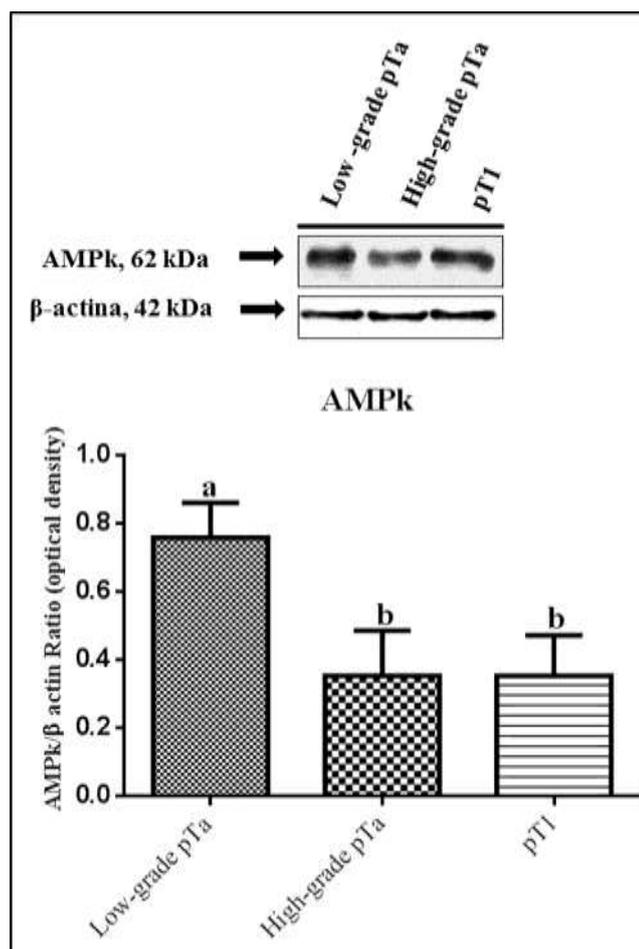


Figura 9. *Western Blotting* representativo e determinação semiquantitativa para os níveis proteicos de AMPk. As amostras da bexiga urinária foram agrupadas de 5 pacientes por grupo para cada repetição (duplicada) e utilizadas para a densitometria semi-quantitativa (IOD - Densidade óptica integrada) dos níveis de AMPk após a normalização com β -actina. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*. Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1.

5.5. Índice Bioenergético Celular

Considerando o IBEC calculado como a intensidade da banda de β -F1-ATPase dividida pela intensidade da banda hsp60 e, essa razão dividida pela intensidade da banda GAPDH, observou-se que tumores de baixo grau (Carcinoma pTa de baixo grau) apresentam índice bioenergético maior em relação aos tumores de alto grau (Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1), nos quais foi evidente o predomínio da via glicolítica (Figura 10).

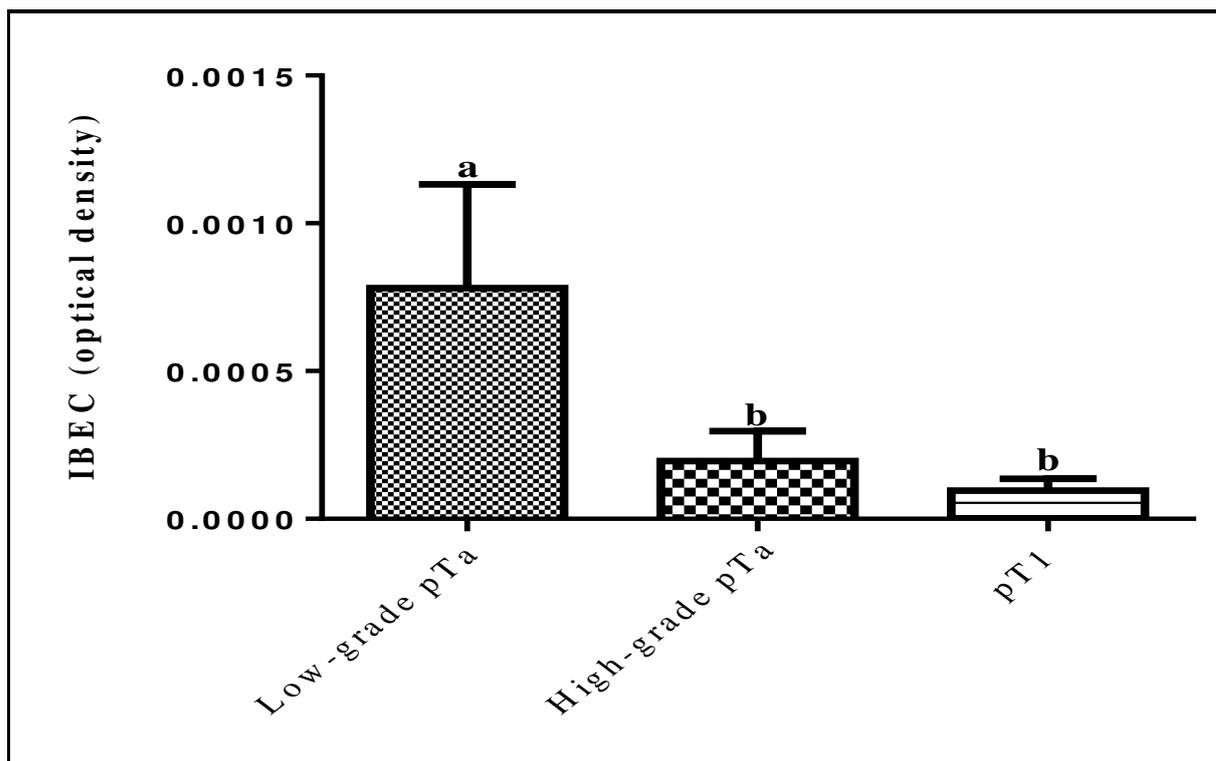


Figura 10. Índice Bioenergético Celular dos Grupos: Carcinoma pTa de baixo grau, Carcinoma pTa de alto grau e Carcinoma pT1. Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferentes letras minúsculas (a, b) indicaram diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os grupos após o teste de *Tukey*.

6. DISCUSSÃO

As células neoplásicas em proliferação apresentam necessidades metabólicas que as diferem das células normais (31). Perante essas necessidades e a fim de apoiar a elevada taxa de proliferação, tais células consomem nutrientes adicionais e desviam os nutrientes destinados para a síntese de outras macromoléculas (48). As vias metabólicas conseqüentemente devem ser readequadas, de tal forma que haja um equilíbrio nos processos biossintéticos com a produção de ATP suficiente para suportar o crescimento e sobrevivência celular (48).

Como as células neoplásicas dependem destas alterações metabólicas, estas vias representam pontos estratégicos para alvos terapêuticos, porém encontrar uma janela terapêutica entre a proliferação de células neoplásicas e células normais em proliferação tem sido um grande desafio para o desenvolvimento de terapias antitumorais bem-sucedidas norteadas pelas vias metabólicas (48). Embora muito esforço tenha ocorrido nesse sentido, a heterogeneidade dos diversos tipos de cânceres e mesmo diferenças dentro de um mesmo tipo, torna essa busca infinda e ainda carente de mais informações. Nesse contexto, cabe ressaltar que este projeto de pesquisa é único na literatura, pois analisou as proteínas relacionadas ao metabolismo energético nos diferentes graus histológicos (pTa baixo grau, pTa alto grau e pT1) do CBNMI, bem como determinou o índice bioenergético desta neoplasia.

No presente estudo foi observado uma significativa diferença no metabolismo energético do CBNMI de baixo grau em relação aos de alto grau. Os tumores de baixo grau apresentaram uma avidez pela via da OXPHOS, enquanto os de alto grau pela via glicolítica. Tais resultados foram alcançados analisando proteínas de diferentes vias metabólicas.

Os tumores pTa baixo grau tiveram um IBEC alto por ter predomínio da OXPHOS observada pela intensa imunorreatividade, pelos maiores níveis proteicos de β -F1-ATPase, pela baixa imunorreatividade e pelo baixo nível proteico de GADPD. Apresentaram também intensa imunorreatividade, altos níveis proteicos para HADHSC e PDH. Tiveram também uma baixa imunorreatividade, baixos níveis proteicos para GLUT 1 e PFK.

O aumento da atividade de β -F1-ATPase demonstra uma maior atividade mitocondrial, já que esta proteína atravessa a membrana mitocondrial interna e é a responsável pela conversão de ADP em ATP. Isso ocorre através da combinação de ADP com um radical fosfato iônico livre, adicionando assim outra ligação fosfato de alta energia a molécula. O processo final ocorre quando o ATP é transportado por difusão facilitada da mitocôndria para o citoplasma. Após o término de todo processo cada molécula de glicose gerou 38 ATPs, dióxido de carbono e água (76). A proteína HADHSC transforma acetil-coA graxo em acetil-coA, e o PDH transforma piruvato em acetil-coA, ambas alteram diferentes substratos em acetil-coA, para assim gerar energia nas mitocôndrias. Estas proteínas estão intimamente relacionadas a OXPHOS, e este é o típico metabolismo de células normais, por não ter desvio de via metabólica para gerar outros substratos, e também por ocorrer em ambiente com níveis normais de oxigênio (32). Portanto o IBEC alto nestes tumores pode passar a ser um indicador de bom prognóstico e ser capaz de ajudar nas decisões terapêuticas e seguimento destes pacientes.

A proteína CS somente teve diferença na imunorreatividade em relação aos tumores de baixo e alto grau, porém não apresentou dessemelhança nos níveis proteicos entre os grupos. Este resultado pode ter ocorrido uma vez que esta enzima está relacionada diretamente com a velocidade da via e não por desvios de vias metabólicas, porém mais estudos sobre o real papel desta enzima no metabolismo do CBNMI torna-se necessário (40).

Os resultados da Imunohistoquímica e do Western Blotting para os tumores pTa de alto grau e pT1 foram muito similares, porém distintos dos pTa de baixo grau. Apresentaram predomínio da via glicolítica pela intensa a moderada imunorreatividade, pelos maiores níveis proteicos de GLUT 1, PFK e GAPDH. Demonstraram também baixa imunorreatividade, baixos níveis proteicos para β -F1-ATPase, HADHSC e PDH. Dessa forma o IBEC foi mais baixo em relação aos tumores de baixo grau.

O IBEC baixo nos tumores de alto grau demonstra haver uma grande mudança do metabolismo energético normal. Como já havia proposto o cientista alemão Otto Warburg a via glicolítica é a mais utilizada pelas neoplasias malignas (37, 38). Esse autor em 1923, foi um grande visionário, ao estudar o metabolismo e a respiração celular nos tumores, e em 1931 recebeu o Prêmio Nobel ao descobrir a natureza e o modo de ação de enzimas respiratórias. Em 1944 ganhou seu segundo

Prêmio Nobel em fisiologia com seu trabalho sobre nicotinamida. O aumento do metabolismo nas células tumorais demanda maior utilização de ATP, e como a via glicolítica produz muito menos ATP que a fosforilação oxidativa, algumas enzimas tem sua atividade aumentada para poder suprir as necessidades energéticas destas células. A GLUT 1 pertence a família das moléculas transportadoras de glicose e tem grande importância neste cenário, por ser a responsável pela entrada da glicose na célula. Na literatura já vem sendo demonstrado o aumento de sua atividade em uma série de neoplasias, como em câncer de pâncreas, ovário, rim, entre outros (49). Esta avidéz pela glicose pode ser medida pelo PET-CT (*“Positron Emission Tomography – Computed Tomography”*) por ser um exame que avalia o metabolismo das estruturas pela captação da glicose radiotraçada com o radiofármaco F18-Fluordesoxiglicose (FDG). Uma lesão com grande captação de glicose radiotraçada significa ser metabolicamente ativa, por isso pode ser mais agressiva (49). Em câncer de bexiga suas maiores indicações são estadiamento linfonodal, presença de metástase a distância e recorrência após tratamento definitivo (77).

Outras proteínas que participam ativamente na glicólise são a PFK e a GAPDH, enzimas importantes na degradação da glicose e geração de energia. A LDH-A é outra proteína com grande valor no metabolismo de células tumorais, com ela o piruvato é transformado em lactato que será transportado para fora do citoplasma, para depois ser utilizado na produção de outras moléculas pela mesma célula, ou ser utilizado por células vizinhas. Este processo assegura a célula tumoral produção de energia e fornecimento de substratos mesmo em um ambiente hipóxico e ácido, gerado pelo alto metabolismo e baixa perfusão. Este ambiente ácido peritumoral protege a célula tumoral da apoptose e facilita o processo de invasão a outros tecidos (78, 79). Em nosso estudo a LDH-A apresentou maiores índices nos tumores pT1 em relação aos demais, talvez por ser um tumor mais indiferenciado. Assim um IBEC baixo nestas neoplasias pode ser mais um fator desfavorável que ajude nas decisões terapêuticas, principalmente na indicação de uma nova RTU (Re-RTU) ou até mesmo de uma cistectomia radical precoce.

Não houve alteração da estrutura da mitocôndria entre os grupos, tanto na imunorreatividade como nos níveis proteicos da proteína hsp60. Este dado é um indicativo de que a função mitocondrial pode ser restaurada nos tumores de alto grau em que a OXPHOS foi diminuída, como havia já observado Fantin et al (42).

Os tumores pTa de alto grau tiveram comportamento metabólico muito similar aos tumores pT1, tumores com alta probabilidade de recorrência e progressão para doença músculo invasiva, por isso devem ser tratados de forma agressiva. Os tumores pT1 de alto grau devem ser submetidos a uma Re-RTU (nova RTUB) após 4 a 6 semanas da primeira ressecção, principalmente se ausência de muscular própria na primeira ressecção, uma vez que ocorre mudança de conduta de 10 a 25% dos casos (80). Outros fatores prognósticos que devem ser levados em consideração para decisão terapêutica são: multifocalidade (> 3 lesões), tumores maiores de 3 cm, tratamento prévio com BCG e presença de carcinoma “*in situ*” associado (29). Em estudo multi-institucional retrospectivo com 2.451 pacientes analisados após tratamento com BCG em pT1 alto grau, a Re-RTU trouxe benefício na sobrevida livre de progressão e sobrevida global somente nos casos com ausência de muscular própria na primeira RTU (81). Os resultados obtidos neste estudo são inéditos, e a utilização na prática clínica do IBEC pode ser mais uma ferramenta para auxiliar nas decisões terapêuticas, principalmente para os tumores pTa de alto grau que muitas vezes não são tratados de forma agressiva como um pT1. Cieza et. al. avaliaram o IBEC em adenocarcinomas de pulmão, e puderam demonstrar que o IBEC era menor nos tumores grandes (>3 cm) quando comparado com tumores menores e com pulmões sem neoplasia. O IBEC também se correlacionou com o estágio tumoral, mostrando que tumores com estadio IA tinham um IBEC 2.5 vezes maior que os tumores IB, demonstrando uma clara relação com prognóstico da doença (72).

As células em proliferação estão a todo momento precisando de energia e utilizam principalmente glicose e glutamina. Estes em conjunto são utilizados para produção de ácidos nucleicos principalmente pelo ciclo da pentose (58). Fatores de crescimento ativam o gene Ras, e este ativa uma série de vias metabólicas que estimulam a glicólise. A via PI3K/AKT é uma delas, ativa a glicólise estimulando a proteína transportadora de glicose GLUT 1 e PFK (58). O AMPk além de promover a parada do ciclo celular em situações de falta de energia, participa da inativação do mTOR, que juntamente com mTORC1 regulam a tradução proteica e proliferação. Quando o mTOR está hiperestimulado pela falta de inibição pelo AMPk ou por mutação do supressor tumoral TSC, parece haver um direcionamento para via glicolítica e das pentoses, pela demanda aumentada de energia e substratos (62, 63). No presente estudo também foi observado uma diminuição da atividade da

AMPk nos tumores de alto grau (pTa de alto grau e pT1) em relação aos de baixo grau. Por ser uma proteína que promove a parada do ciclo celular em decorrência do estresse metabólico em tecidos normais, e por inibir o mTOR deduzimos que os tumores de alto grau acabam não tendo este controle metabólico e continuam se desenvolvendo, para isso se utilizam de vias metabólicas alternativas para suprir esta demanda energética aumentada.

Mesmo com tratamento local agressivo (RTU + Re-RTU + BCG) alguns tumores de alto grau vão recorrer e progredir para tumores músculo invasivos durante o seguimento. Estes pacientes têm pior prognóstico em relação aos com doença músculo invasiva já na apresentação da moléstia. Moschini et. al. demonstraram em uma série retrospectiva com 768 pacientes submetidos a cistectomia radical devido a tumores músculo invasivos (475 pacientes), ou tumores superficiais que progrediram para músculo invasivo, mesmo após terapias intravesicais durante o seguimento (293 pacientes). Na análise univariada e multivariada o grupo não músculo invasivo que progrediu durante o seguimento teve piores resultados em relação a recorrência livre de progressão, mortalidade câncer específica e mortalidade global em 10 anos (82). Portanto pacientes com CBNMI pT1 devem ser submetidos a tratamentos agressivos, sendo uma das opções a CR precoce, principalmente se falha da BCG após RTUB e Re-RTUB. Como os pTa de alto grau foram metabolicamente muito semelhantes aos pT1, devemos trata-los da mesma forma que os pT1, principalmente se apresentarem mais achados além do IBEC baixo, como: diminuição da expressão de AMPk, tumores maiores que 3 cm e tumores múltiplos.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou caracterizar e comparar o perfil do metabolismo energético celular nos diferentes graus histológicos do carcinoma urotelial de bexiga não músculo invasivo (pTa baixo grau, pTa alto grau, pT1). Também proporcionou a adaptação do IBEC para estes tumores, fato inédito até o momento, ou seja, os tumores pTa de baixo grau tiveram predomínio da fosforilação oxidativa em relação a glicólise, com um IBEC alto, já os tumores pTa de alto grau e pT1 tiveram predomínio da glicólise em relação a fosforilação oxidativa, com IBEC baixo. Em relação a expressão do AMPk, os tumores pTa de baixo grau tiveram alta expressão e os pTa de alto grau e pT1 uma baixa expressão. Com isso podemos utilizar o IBEC e o AMPk como mais uma ferramenta na condução destes casos, uma vez que os tratamentos são agressivos e muitas vezes mutilantes.

REFERÊNCIAS

1. M. Babjuk (Chair), M. Burger (Vice-Chair), E. Compérat, P. Gontero, A.H. Mostafid, J. Palou, et al. EAU Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (Ta, T1 and CIS). European Association of Urology. 2017:47.
2. Overview: bladder cancer. In: What are the key statistics about bladder cancer? [Internet]. AMERICAN CANCER SOCIETY. 2018 [cited 12/-6/2018, às 16:00h.]. Available from: <https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/bladder-cancer/about/key-statistics/>.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin. 2013;63(1):11-30.
4. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). Oncol Lett. 2012;4(6):1151-7.
5. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures [Internet]. AMERICAN CANCER SOCIETY. 2017 [cited 27/10/2017 às 20:30h.]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>.
6. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - Rio de Janeiro: INCA [Internet]. Ministério da Saúde. 2018 [cited 14/06/18 às 16:40]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
7. Lopez-Beltran A. Bladder cancer: clinical and pathological profile. Scand J Urol Nephrol Suppl. 2008(218):95-109.
8. Ro JY, Staerckel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. Urol Clin North Am. 1992;19(3):435-53.

9. Donat SM. Evaluation and follow-up strategies for superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 2003;30(4):765-76.
10. Sylvester RJ, van der Meijden A, Witjes JA, Jakse G, Nonomura N, Cheng C, et al. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology.* 2005;66(6 Suppl 1):90-107.
11. Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J. Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(1):73-8.
12. Comperat E, Varinot J. Immunochemical and molecular assessment of urothelial neoplasms and aspects of the 2016 World Health Organization classification. *Histopathology.* 2016;69(5):717-26.
13. Herr HW. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. *J Urol.* 2000;163(1):60-1; discussion 1-2.
14. Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, Ulbright TM, Reuter VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):106-19.
15. Cote RJ, Chatterjee SJ. Molecular determinants of outcome in bladder cancer. *Cancer J Sci Am.* 1999;5(1):2-15.
16. Richter J, Jiang F, Gorog JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, et al. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1997;57(14):2860-4.
17. Althausen AF, Prout GR, Jr., Daly JJ. Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol.* 1976;116(5):575-80.

18. Kunju LP, You L, Zhang Y, Daignault S, Montie JE, Lee CT. Lymphovascular invasion of urothelial cancer in matched transurethral bladder tumor resection and radical cystectomy specimens. *J Urol*. 2008;180(5):1928-32; discussion 32.
19. Lotan Y, Gupta A, Shariat SF, Palapattu GS, Vazina A, Karakiewicz PI, et al. Lymphovascular invasion is independently associated with overall survival, cause-specific survival, and local and distant recurrence in patients with negative lymph nodes at radical cystectomy. *J Clin Oncol*. 2005;23(27):6533-9.
20. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer*. 2000;89(3):630-9.
21. Sridhar SS. Evolving Treatment of Advanced Urothelial Cancer. *J Oncol Pract*. 2017;13(5):309-15.
22. Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A, Jacob J. Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ*. 2000;247(1):81-90.
23. O'Donnell MA. Practical applications of intravesical chemotherapy and immunotherapy in high-risk patients with superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 2005;32(2):121-31.
24. Lamm DL, van der Meijden PM, Morales A, Brosman SA, Catalona WJ, Herr HW, et al. Incidence and treatment of complications of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy in superficial bladder cancer. *J Urol*. 1992;147(3):596-600.
25. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976;116(2):180-3.
26. Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol*. 2003;170(3):964-9.

27. Schamhart DH, de Boer EC, de Reijke TM, Kurth K. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: their practical use. *Eur Urol.* 2000;37 Suppl 3:16-23.
28. Pook SH, Esuvaranathan K, Mahendran R. N-acetylcysteine augments the cellular redox changes and cytotoxic activity of internalized mycobacterium bovis in human bladder cancer cells. *J Urol.* 2002;168(2):780-5.
29. Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, Peters CA. Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer (Ta, T1, and CIS). *Campbell-Walsh Urology. Eleventh Edition.* 1600 John F. Kennedy Blvd Ste 1800, Philadelphia, PA 19103-2899: Elsevier; 2016. p. 2205-22.
30. Bochner BH, Hansel DE, Efstathiou JA, Konety B, Lee CT, McKiernan JM, et al. *AJCC Cáncer Staging Manual 2016.* Available from: www.cancerstaging.org.
31. Amoedo ND, Valencia JP, Rodrigues MF, Galina A, Rumjanek FD. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells. *Biosci Rep.* 2013;33(6).
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
33. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029-33.
34. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(3):985-93.
35. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7(1):11-20.

36. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85-95.
37. Warburg O. *The Metabolism of Tumours: Investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem* (London, UK: Arnold Constable). 1930.
38. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science (New York, NY)*. 1956(124):269-70.
39. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(5):325-37.
40. Lim HY, Ho QS, Low J, Choolani M, Wong KP. Respiratory competent mitochondria in human ovarian and peritoneal cancer. *Mitochondrion*. 2011;11(3):437-43.
41. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J Biol Chem*. 2011;286(49):42626-34.
42. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2006;9(6):425-34.
43. Sukanuma K, Miwa H, Imai N, Shikami M, Gotou M, Goto M, et al. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(11):2112-9.
44. Zu XL, Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(3):459-65.
45. Herst PM, Berridge MV. Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(2):170-7.

46. Rodriguez-Enriquez S, Carreno-Fuentes L, Gallardo-Perez JC, Saavedra E, Quezada H, Vega A, et al. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(10):1744-51.
47. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal.* 2007;274(6):1393-418.
48. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):671-84.
49. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):654-62.
50. Sugden MC, Holness MJ. The pyruvate carboxylase-pyruvate dehydrogenase axis in islet pyruvate metabolism: Going round in circles? *Islets.* 2011;3(6):302-19.
51. Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(4):227-32.
52. Cuezva JM, Krajewska M, de Heredia ML, Krajewski S, Santamaria G, Kim H, et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* 2002;62(22):6674-81.
53. Isidoro A, Casado E, Redondo A, Acebo P, Espinosa E, Alonso AM, et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis.* 2005;26(12):2095-104.
54. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009;23(5):537-48.
55. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev.* 2010;20(1):51-6.

56. Koster R, Timmer-Bosscha H, Bischoff R, Gietema JA, de Jong S. Disruption of the MDM2-p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway. *Cell Death Dis.* 2011;2:e148.
57. Sermeus A, Michiels C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis.* 2011;2:e164.
58. Munoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis.* 2012;3:e248.
59. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 2006;126(1):107-20.
60. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science.* 2006;312(5780):1650-3.
61. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(16):7461-6.
62. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, et al. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(10):3329-35.
63. Choo AY, Kim SG, Vander Heiden MG, Mahoney SJ, Vu H, Yoon SO, et al. Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol Cell.* 2010;38(4):487-99.
64. Smolkova K, Plecita-Hlavata L, Bellance N, Benard G, Rossignol R, Jezek P. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(7):950-68.

65. Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest.* 2008;118(12):3835-7.
66. Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol.* 2009;92(3):329-33.
67. Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* 2010;6(1):127-48.
68. Hardee ME, Dewhirst MW, Agarwal N, Sorg BS. Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Curr Mol Med.* 2009;9(4):435-41.
69. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet.* 2003;33(1):49-54.
70. Qiu Y, Cai G, Zhou B, Li D, Zhao A, Xie G, et al. A distinct metabolic signature of human colorectal cancer with prognostic potential. *Clin Cancer Res.* 2014;20(8):2136-46.
71. Isidoro A, Martinez M, Fernandez PL, Ortega AD, Santamaria G, Chamorro M, et al. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J.* 2004;378(Pt 1):17-20.
72. Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro A, Misek DE, Hanash SM, et al. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis.* 2004;25(7):1157-63.
73. Vallejo CG, Cruz-Bermudez A, Clemente P, Hernandez-Sierra R, Garesse R, Quintanilla M. Evaluation of mitochondrial function and metabolic reprogramming during tumor progression in a cell model of skin carcinogenesis. *Biochimie.* 2013;95(6):1171-6.
74. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of

urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. The American Journal of Surgical Pathology. 1998;22(12):1435-48.

75. Reis LO, Ferreira U, Billis A, Cagnon VH, Favaro WJ. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. J Urol. 2012;187(2):438-45.

76. Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. Décima ed. Philadelphia, PA 19106 2002. 720 - 8 p.

77. Bouchelouche K, Choyke PL. PET/CT in renal, bladder and testicular cancer. PET Clin. 2015;10(3):361-74.

78. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. Cancer Metastasis Rev. 2007;26(2):299-310.

79. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. Blood. 2007;109(9):3812-9.

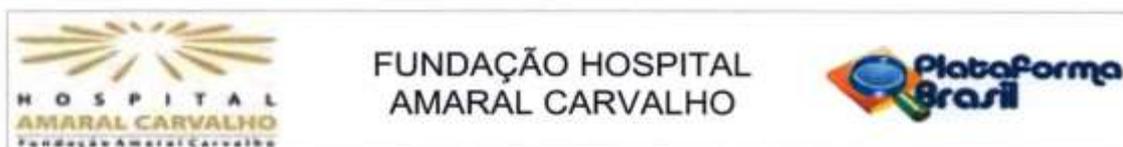
80. Kitamura H, Kakehi Y. Treatment and management of high-grade T1 bladder cancer: what should we do after second TUR? Jpn J Clin Oncol. 2015;45(4):315-22.

81. Gontero P, Sylvester R, Pisano F, Joniau S, Oderda M, Serretta V, et al. The impact of re-transurethral resection on clinical outcomes in a large multicentre cohort of patients with T1 high-grade/Grade 3 bladder cancer treated with bacille Calmette-Guerin. BJU Int. 2016;118(1):44-52.

82. Moschini M, Sharma V, Dell'oglio P, Cucchiara V, Gandaglia G, Cantiello F, et al. Comparing long-term outcomes of primary and progressive carcinoma invading bladder muscle after radical cystectomy. Int BJU. 2016;117(4):604-10.

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.220.165

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não relevante para este parecer.

Vide parecer 1.171.678.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não relevante para este parecer.

Vide parecer 1.171.678.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não relevante para este parecer.

Vide parecer 1.171.678.

Recomendações:

Conforme o parecer CEP 1171678 foi emitida a seguinte recomendação: Corrigir TCLE.

a documentação esta de acordo com os requisitos legais e locais. Há, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido um provável erro de digitação quando se refere ao endereço do pesquisador e informa apenas seu endereço de e-mail. O endereço precisa estar completo e precisa ser retirada a frase: "É importante lembrar que o endereço profissional deverá incluir o departamento e-ou ambulatório de atuação dos pesquisadores, para que sejam prontamente localizados."

TCLE Anterior:

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador Guilherme de Almeida Prado Costa pelo celular (014) 99712-1640 ou por e-mail gcostajau@hotmail.com, ou no próprio Hospital Amaral Carvalho, rua Dona Silvéria, 150, CEP 17120-080, pelo telefone (014) 3602-1200, ramal 1350, como já ocorre de rotina com os pacientes da Urologia.

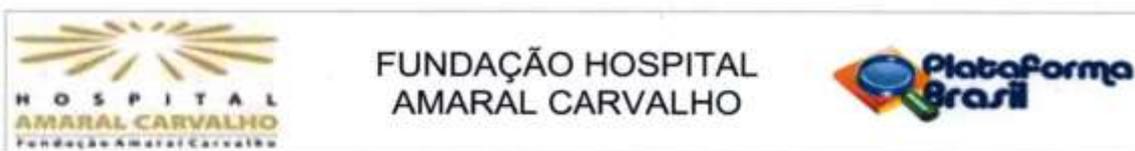
Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação sobre questões éticas do estudo, você Carvalho: Rua das Palmeiras, 89, Vila Assis, Jau/SP, Cep: 17210-120, telefone: (14) 36021194 , e-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br.

TCLE Corrigido:

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador Guilherme de Almeida Prado Costa pelo celular (014) 99712-1640 ou por e-mail gcostajau@hotmail.com, ou

Endereço: Rua das Palmeiras, 89	CEP: 17.210-120
Bairro: VILA ASSIS	
UF: SP	Município: JAU
Telefone: (14)3602-1194	Fax: (14)3602-1207
E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br	



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Caracterização do Metabolismo Energético e Balanço Oxidativo no Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo: pTis, pTa, pT1"

Pesquisador: Guilherme de Almeida Prado Costa

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47475815.9.0000.5434

Instituição Proponente: FUNDACAO DOUTOR AMARAL CARVALHO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.220.165

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: "Caracterização do Metabolismo Energético e Balanço Oxidativo no Câncer de Bexiga Urinária Não-Músculo Invasivo: pTis, pTa, pT1"

Pesquisador Responsável: Guilherme de Almeida Prado Costa

Instituição Proponente: FUNDACAO DOUTOR AMARAL CARVALHO

Versão: 2

CAAE: 47475815.9.0000.5434

Data da Relatoria: 05/08/15

Parecer: 1.171.678

Situação do projeto: Pendente

Objetivo da Pesquisa:

Não relevante para este parecer.

Vide parecer 1.171.678.

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
Bairro: VILA ASSIS **CEP:** 17.210-120
UF: SP **Município:** JAU
Telefone: (14)3602-1194 **Fax:** (14)3602-1207 **E-mail:** cep.aurea@amaralcarvalho.org.br



Continuação do Parecer: 1.220.165

no próprio Hospital Amaral Carvalho, rua Dona Silvéria, 150, CEP 17120-080, pelo telefone (014) 3602-1200, ramal 1350, como já ocorre de rotina com os pacientes da Urologia.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato no Hospital Amaral Carvalho: Rua das Palmeiras, 89, Vila Assis, Jau/SP, Cep: 17210-120, telefone: (14) 36021194 , e-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que as providências foram tomadas sou favorável à APROVAÇÃO do projeto em questão.

Considerações Finais a critério do CEP:

o colegiado acompanha o parecer do relator.

Informamos que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Mestrado Guilherme de Almeida Prado Costa.docx	21/07/2015 15:31:04		Aceito
Outros	Aut. Chefe de Serviço.pdf	22/07/2015 16:59:57		Aceito
Outros	Orçamento.pdf	22/07/2015 17:00:13		Aceito
Outros	Termo de Confidencialidade.pdf	22/07/2015 17:00:36		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	22/07/2015 16:52:33		Aceito
Outros	Currículo Dr. Guilherme.docx	22/07/2015 17:08:39		Aceito
Outros	Currículo - Wagner José Fávaro.docx	22/07/2015 17:09:36		Aceito

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
 Bairro: VILA ASSIS CEP: 17.210-120
 UF: SP Município: JAU
 Telefone: (14)3602-1194 Fax: (14)3602-1207 E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br



Continuação do Parecer: 1.220.165

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_409230.pdf	22/07/2015 17:10:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Dr. Guilherme.docx	05/08/2015 17:05:58		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	24/08/2015 15:18:22	Guilherme de Almeida Prado Costa	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_409230.pdf	24/08/2015 15:18:58		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JAU, 09 de Setembro de 2015

Assinado por:

Oswaldo Contador Junior
(Coordenador)

Oswaldo Contador Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho

Endereço: Rua das Palmeiras, 89

Bairro: VILA ASSIS

CEP: 17.210-120

UF: SP

Município: JAU

Telefone: (14)3602-1194

Fax: (14)3602-1207

E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Caracterização do Metabolismo Energético e Balanço Oxidativo no Câncer de
Bexiga
Urinária Não-Músculo Invasivo: pTis, pTa, pT1

Guilherme de Almeida Prado Costa (pesquisador)
Wagner José Fávaro (orientador)

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para a casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

Os objetivos gerais do presente estudo serão caracterizar e comparar os perfis do metabolismo energético celular e o balanço oxidativo nos diferentes graus histológicos (pTis, pTa, pT1) do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI), bem como determinar o índice bioenergético para se possível estabelecer um critério de relevância clínico-patológica e prognóstica para a classificação desses tumores. Para a realização deste estudo serão utilizados produtos de cirurgias para o tratamento do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI) que o paciente já faria normalmente por indicação médica, mesmo se não participasse do estudo.

No presente trabalho serão utilizadas 45 amostras de tecido de bexiga urinária de homens na faixa etária de 60 a 90 anos com o diagnóstico de lesões da uroteliais, obtidas somente no Hospital Amaral Carvalho. Tais amostras vesicais serão provenientes de um estudo retrospectivo de pacientes submetidos à ressecção transuretral (RTU) e/ou cistectomia radical.

Trata-se de uma pesquisa relevante onde se avaliará a relação entre o metabolismo energéticos e sua relação com as enzimas formados de espécies reativas de oxigênio, de modo que essas relações possam constituir ferramenta para o diagnóstico e seguimento de pacientes com câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI).

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a autorizar o estudo do material proveniente de ressecção transuretral (RTU) e/ou cistectomia radical. Estes procedimentos serão realizados por indicação médica para diagnóstico/tratamento do câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI), e apenas será aproveitado o material decorrente disto. Você não será exposto a nenhum procedimento/riscos superior ao que você teria se você não participasse do estudo.

Desconfortos e riscos:

Você **não** deve participar deste estudo se foi submetido a qualquer forma de tratamento prévio ou se, por qualquer que seja o motivo (ético, religioso, etc) não aceitar disponibilizar o material de biópsia por ressecção transuretral (RTU) e/ou cistectomia radical para o estudo.

Benefícios:

O principal benefício que você terá ao participar desta pesquisa é que estará contribuindo cientificamente para melhorar e desenvolver ferramentas para o diagnóstico e seguimento de pacientes com câncer de bexiga urinária não-músculo invasivo (CBNMI).

Acompanhamento e assistência:

O acompanhamento será realizado no ambulatório de Uro-oncologia, seguindo o protocolo pós operatório.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. O resultado do estudo poderá fazer parte do prontuário médico.

Ressarcimento:

Não haverá qualquer forma de ressarcimento, uma vez que o paciente não terá despesas extras decorrentes de ser participantes do estudo.

Armazenamento de material:

Haverá eventual armazenamento do material não utilizado no laboratório de Biologia Molecular – UNICAMP, para utilização caso haja interesse/necessidade de testes adicionais.

Toda nova pesquisa a ser realizada como o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP);

Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

O descarte do material armazenado será autorizado na situação de não haver interesse/necessidade de testes adicionais.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador Guilherme de Almeida Prado Costa pelo celular (014) 99712-1640 ou por e-mail gcostajau@hotmail.com, ou no próprio Hospital Amaral Carvalho, rua Dona Silvéria, 150, CEP 17120-080, pelo telefone (014) 3602-1200, ramal 1350, como já ocorre de rotina com os pacientes da Urologia.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato no Hospital Amaral Carvalho: Rua das Palmeiras, 89, Vila Assis, Jau/SP, Cep: 17210-120, telefone: (14) 36021194 , e-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecido sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta pode acarretar, aceito participar:

Nome do (a) participante: _____

Data: ___/___/____

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da Resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ___/___/____

(Assinatura do pesquisador)

ANEXO III

PARTICIPANTES DA TESE

Mestrando

Guilherme de Almeida Prado Costa, Médico Urologista.

Departamento de Urologia do Hospital Amaral Carvalho.

Rua Dona Silvéria, 150. CEP: 17210-080. Jaú, SP, Brasil

Contato: (14) 3602-1200; 3625-2000; 99712-1640

Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (LCURGIM)

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Av. Bertrand Russel, s/no. CEP: 13083-865. Campinas, SP, Brasil.

E-mail: gcostajau@gmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1043291730295077>

Orientador

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Laboratório de Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia (LCURGIM)

Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Av. Bertrand Russel, s/no. CEP: 13083-865. Campinas, SP, Brasil.

Contato: (19) 3521-6104 ou (19) 3521-6308

E-mail: wjfavaro@gmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8604379826351440>

Colaborador

Petra Karla Böckelmann

Pos-doc em Carcinogênese Urogenital e Imunoterapia

Departamento de Biologia Funcional e Estrutural.

Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Caixa Postal: 6109 CEP: 13.083-865, Campinas (SP) - Brasil

Contato: + 55 19 3521 6308

E-mail: petrakarla@hotmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2027734422908736>

Colaborador

Arthur Degani Ottaiano

Departamento de Biologia Funcional e Estrutural.

Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Caixa Postal: 6109 CEP: 13.083-865, Campinas (SP) - Brasil

Contato: + 55 19 3521 6308

E-mail: arthurdegani@hotmail.com

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6447393942456776>

Processo Fapesp: 2015/22799-6