

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CDTec – Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Graduação Bacharelado em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



Prospecção *in silico* de Proteínas Biomarcadoras para Câncer de Bexiga Musculo-Invasivo

Isadora Leitzke Guidotti

Pelotas, 2019

Isadora Leitzke Guidotti

Prospecção *in silico* de Proteínas Biomarcadoras para Câncer de Bexiga Musculo-Invasivo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Luciano da Silva Pinto

Co-Orientador (es): Amanda Munari Guimarães

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G111p Guidotti, Isadora Leitzke

Prospecção *in silico* de proteínas biomarcadoras para
câncer de bexiga musculo-invasivo / Isadora Leitzke
Guidotti ; Luciano da Silva Pinto, orientador ; Amanda
Munari Guimarães, coorientadora. — Pelotas, 2019.

57 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em
Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Marcadores moleculares. 2. Neoplasias. 3. Carcinoma
papilar. I. Pinto, Luciano da Silva, orient. II. Guimarães,
Amanda Munari, coorient. III. Título.

CDD : 616.992

Isadora Leitzke Guidotti

Prospecção *in silico* de Proteínas Biomarcadoras para Câncer de Bexiga Musculo-Invasivo

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13 de novembro de 2019

Banca examinadora:

**Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

**Mestranda Amanda Munari Guimarães
Bacharela em Biotecnologia Pela Universidade Federal de Pelotas**

**Prof^a. Dr^a. Fabiana Kömmling Seixas
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas**

Dedico este trabalho à minha família e meus amigos que sempre estiveram ao meu lado apoiando minhas escolhas

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família que durante toda a minha vida me deu suporte e apoio para que eu pudesse realizar meus sonhos. Em especial aos meus pais que se desdoblaram em vários para conseguir me dar tudo que eu tenho e me ajudar a chegar até aqui, os quais estiveram presentes em todos esses anos, me incentivando e me dando força para seguir em frente mesmo com todos os problemas que houveram no decorrer desses últimos quatro anos.

Meus agradecimentos também vão para a Universidade Federal de Pelotas, que ajudou por meio dos auxílios permitiu que eu me manter durante esses anos e pela oportunidade de aprendizado.

Queria agradecer também ao grupo de pesquisa o qual eu faço parte, por toda a oportunidade e apoio em começar esse projeto do zero. A cada membro do BioPro Lab, seja da bioinformática ou da bancada, todos sempre serviram de inspiração. Em especial queria agradecer ao meu orientador, o Professor Luciano, que antes mesmo que eu fizesse parte do laboratório me ajudou ainda enquanto coordenador do curso com os problemas que ocorreram no decorrer do curso, o qual também apoiou o desenvolvimento desse projeto e que é uma pessoa que admiro muito e um dia espero ser uma profissional tão bom quanto ele é. A Amanda, que de longe foi a pessoa que esteve mais presente junto comigo para desenvolver este trabalho, me dando sugestões, me encaminhando e sempre disponível para me ajudar.

Por último gostaria de agradecer aos meus amigos que me aguentaram, me apoiaram, me ouviram desabafar. Sem vocês eu não teria conseguido aguentar tudo que o que aconteceu.

Agradeço a vida por ter me proporcionado tanta coisa boa e tanto crescimento pessoal e profissional nesses últimos anos. Agradeço a cada uma das pessoas que passaram pela minha vida e me tornaram quem eu sou hoje. Agradeço a cada problema, decepção, surto, alegria, a cada momento que eu vivi com cada uma dessas pessoas as quais não preciso citar nomes porque sabem o quão são importantes para mim.

Resumo

GUIDOTTI, Isadora Leitzke. Prospecção *in silico* de Proteínas Biomarcadoras para Câncer de Bexiga Musculo-Invasivo. 2019. Trabalho de conclusão de curso – Graduação de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O câncer de bexiga é uma neoplasia com diferentes subtipos, sendo que o subtipo muscular-invasivo é o que apresenta o pior prognóstico. Para diagnosticar essa neoplasia o teste considerado padrão ouro é o de cistoscopia, um exame extremamente invasivo, que ocasiona em alguns efeitos colaterais ruins. Além de ser usado para diagnosticar a doença, também utilizado para rastreamento de recidiva da neoplasia. Em vista disso, o objetivo desse trabalho é prospectar proteínas biomarcadoras de maneira *in silico* por meio de ferramentas de bioinformática. Em um primeiro momento foi utilizado bancos de dados do NCBI, em especial o PubMed que é um banco de artigos biomédicos, usado para realizar uma busca na bibliografia por proteínas gerais para câncer de bexiga musculo-invasivo e para câncer de bexiga não-musculo-invasivo, onde foram encontradas 24 proteínas com potencial biomarcador para diagnóstico. Esta mesma plataforma foi utilizada para filtrar proteínas com potencial biomarcador exclusivamente para câncer de bexiga musculo-invasivo, de forma que o número de proteínas foi reduzido a 10. A plataforma do BlastKoala foi utilizada para analisar as rotas metabólicas de cada uma dessas proteínas, e selecionar aquelas que estivessem função relacionada a doença humana, além disso essa análise categorizou-se como uma segunda filtragem para proteínas com potencial biomarcador para carcinoma musculo-invasivo, reduzindo novamente esse número a 3 proteínas alvos. As 3 proteínas alvos apresentam superexpressão em pacientes com essa neoplasia, além de duas delas formarem um complexo proteico onde uma proteína protege a outra da autodegradação, que por sua vez torna o ambiente tumoral mais favorável para o crescimento e proliferação das células cancerígenas. Esse complexo só é encontrado em pacientes com câncer de bexiga invasivo e pode servir como um potente biomarcador para esta doença.

Palavras-chaves: Marcadores moleculares. Neoplasias. Carcinoma Papilar.

Abstract

GUIDOTTI, Isadora Leitzke. In silico Prospecting of Biomarker Proteins for Muscle-Invasive Bladder Cancer. 2019. Course conclusion work - Biotechnology Graduation, Center for Technological Development, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Bladder cancer is a neoplasm with different subtypes, with the invasive muscle subtype presenting the worst prognosis. To diagnose this neoplasm the gold standard test is cystoscopy, an extremely invasive test that causes some bad side effects. In addition to being used to diagnose the disease, it is also used for cancer recurrence screening. Therefore, the objective of this work is to prospect biomarker proteins in silico using bioinformatics tools. Initially, NCBI databases were used, in particular PubMed, which is a biomedical database, used to search the bibliography for general proteins for muscle-invasive bladder cancer and non-musculoskeletal bladder cancer. 24 proteins with biomarker potential for diagnosis were found. This same platform was used to filter proteins with biomarker potential exclusively for muscle-invasive bladder cancer, so that the number of proteins was reduced to 10. The BlastKoala platform was used to analyze the metabolic pathways of each of these proteins, and selecting those that were related to human disease, this analysis was further categorized as a second filter for proteins with potential biomarker for musculoskeletal carcinoma, again reducing this number to 3 target proteins. The 3 target proteins are overexpressed in patients with this cancer, and two of them form a protein complex where one protein protects the other from self-degradation, which in turn makes the tumor environment more favorable for cancer cell growth and proliferation. This complex is only found in patients with invasive bladder cancer and can serve as a potent biomarker for this disease.

Keywords: Molecular markers. Neoplasms. Papillary carcinoma.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de bexiga maligno para 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018.....	14
Figura 2. Padrões morfológicos.....	16
Figura 3. Estadiamento TNM do câncer de bexiga.....	20
Figura 4. Tipos e estágios do câncer de bexiga.....	21
Figura 5. Caminhos da patogênese.....	23
Figura 6. Esquema do exame de cistoscopia sendo realizado em mulher e homem.....	28
Figura 7. Resumo da metodologia utilizada nesse trabalho.....	37
Figura 8. Estrutura predita no software I-Tasser da proteína PA14.....	45
Figura 9. Estrutura predita no software I-Tasser da proteína PA19.....	46
Figura 10. Estrutura predita no software I-Tasser da proteína PA20.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Referente as ferramentas de bioinformática desenvolvidas para analisar dados biológicos de mutações genômicas em câncer.....	31
Tabela 2. Proteínas com potencial biomarcador para câncer de bexiga do tipo invasivo.....	42
Tabela 3. Análises de domínios Pfam para as três proteínas selecionadas nas etapas anteriores da pesquisa.....	44

Sumário

1. Introdução	12
2. Revisão Bibliográfica	13
2.1. Bexiga.....	13
2.2. Epidemiologia.....	14
2.3. Tipos de câncer de bexiga.....	15
2.3.1. Câncer de bexiga não musculo-invasivo.....	15
2.3.2. Câncer de bexiga musculo-invasivo.....	15
2.3.3. Carcinomas papilares.....	16
2.3.4. Carcinomas planos.....	16
2.4. Subtipos histológicos de câncer de bexiga.....	17
2.4.1. Carcinoma urotelial.....	17
2.4.2. Carcinoma de células escamosas.....	17
2.4.3. Adenocarcinoma.....	17
2.4.4. Carcinoma sarcomatóide.....	18
2.4.5. Carcinoma de pequenas células.....	18
2.5. Classificação de tumores.....	18
2.5.1. Classificação de estadiamento TNM.....	18
2.5.2. Classificação de graduação histológica.....	20
2.6. Fatores de risco.....	21
2.7. Biologia molecular do câncer de bexiga.....	22
2.8. Sintomatologia.....	24
2.9. Diagnóstico em câncer de bexiga.....	25
2.9.1. Citologia, cultura e exame de urina.....	25
2.9.2. Marcadores tumorais.....	26
2.9.3. Cistoscopia.....	27
2.10. Tratamento.....	28
2.10.1. Tratamento cirúrgico.....	29
2.10.2. Quimioterapia e radioterapia.....	29
2.10.3. Imunoterapia.....	29
2.11. Bioinformática.....	30
2.11.1. Projeto TCGA.....	31
2.11.2. Expressão gênica para estudo de câncer de bexiga.....	34

3. Objetivos	35
3.1. Objetivos gerais.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. Materiais e métodos	36
4.1. Identificação de possíveis alvos na literatura.....	36
4.2. Filtragem de proteínas para câncer de bexiga invasivo.....	36
4.3. Obtenção das sequências das proteínas para câncer de bexiga musculo-invasivo.....	38
4.4. Análises de rotas metabólicas.....	38
4.5. Revisão de patentes.....	39
4.6. Análises de interações proteicas.....	39
4.7. Obtenção de sequências dos domínios.....	40
4.8. Análises de domínios com a ferramenta PFam.....	40
4.9. Predição de estruturas via I-Tasser.....	41
5. Resultados	42
5.1. Busca por alvos em bancos de dados.....	42
5.2. Proteínas de câncer de bexiga musculo-invasivo.....	42
5.3. Análises de rotas metabólicas com o BlastKoala.....	42
5.4. Revisão de patentes.....	43
5.5. Análises de interação de rotas metabólicas com o String.....	44
5.6. Análise de domínios com o Pfam.....	44
6. Discussão	47
7. Conclusão	51
8. Referências	52

1. Introdução

Em 2018, segundo o site *International Agency for Research on Cancer* da *World Health Organization*, foram notificados aproximadamente 550 mil novos casos de câncer de bexiga no mundo e cerca de 200 mil óbitos ao ano. No período de 5 anos essa neoplasia atingiu aproximadamente 1.650.000 de pessoas, sendo então a sexta neoplasia mais prevalente no mundo afetando mais homens do que mulheres. No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram notificados em 2018 cerca de 7 mil novos casos para o sexo masculino. Além disso, a cada 100 mil habitantes, aproximadamente, 3 mil novos casos para o sexo feminino.

O câncer de bexiga apresenta alguns subtipos da neoplasia e dentre os fatores de risco que estão relacionados a esse tipo de câncer estão, idade e etnia do paciente, tabagismo, exposição ocupacional e outros. O diagnóstico é a o que apresenta maior dificuldade visto que possui alto custo e é extremamente invasivo. O exame é a cistoscopia que é o mais confiável e o padrão ouro para diagnóstico. Apesar de existirem já no mercado marcadores tumorais para esse tipo de diagnóstico nenhum deles é tão confiável quanto a cistoscopia.

A bioinformática é uma das ferramentas que tem sido amplamente utilizada em diversas áreas da biotecnologia. Através dela é possível sequenciar o genoma de organismo ainda desconhecidos e estudar o genoma das espécies, e realizar a mineração de dados biológicos. Os bancos de dados desenvolvidos nos últimos anos geraram uma grande quantidade de dados biológicos e devido a isso é necessário serem minerados, para isso o *data mining* que é um processo de mineração de dados que consiste em algumas etapas que incluem, definição dos resultados a serem obtidos, limpeza, integração, seleção e transformação que visa encontrar incoerências, erros de preenchimento.

Em vista disso, é importante ter estudos na área que busquem por proteínas que possam ser encontradas na urina com potencial para biomarcadores de câncer de bexiga, a fim de facilitar o diagnóstico. Devido a esta problemática o objetivo deste trabalho é identificar de maneira *in silico* através de abordagens de bioinformática proteínas com potencial biomarcador para diagnóstico de câncer de bexiga musculo-invasivo.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Bexiga

A bexiga é um órgão que faz parte do sistema urinário, localizado na pelve, responsável pela armazenagem da urina. Possui uma musculatura elástica e, por ser um órgão oco, consegue armazenar cerca de 700 ml a 800 ml de urina. Contém três aberturas, duas para os ureteres e uma para a uretra formando uma região triangular chamada de trígono da bexiga, além disso é formada por três camadas de tecidos (FILHO; PEREIRA, 2009).

A bexiga é formada por 3 camadas de tecidos, as quais também revestem todas as outras vias excretoras, exceto a uretra. Essas camadas são uma mucosa revestida por epitélio de transição, uma muscular e uma adventícia. A camada mucosa é, também, conhecida como uretélia e forma uma interface entre o espaço urinário, vasos sanguíneos, nervos, tecido conjuntivo e células musculares lisas subjacentes. As células presentes nessa camada são poliédricas grandes com um ou mais núcleos, que têm capacidade de mudar sua forma conforme o estado de enchimento da bexiga. Quando vazia apresentam formato cuboide e quando a bexiga está distendida elas apresentam formato plano e pavimentosas. A camada de músculo liso é disposta em uma camada longitudinal interna e uma circular externa, essa organização também é encontrada nos ureteres. Essa camada muscular auxilia no movimento peristáltico e força a urina para a frente. Na junção entre a bexiga e a uretra, a musculatura da bexiga fica mais espessa no esfíncter interno, o qual quando fica relaxado, permite que ocorra a micção (KÖNIG; LIEBICH, 2016). A camada adventícia envolve a parte externa da bexiga (GARTNER; HIATT, 2003).

A bexiga é inervada pelas divisões parassimpáticas e simpática do sistema nervoso autônomo, onde as fibras parassimpáticas são originadas da medula espinhal. Essas fibras terminam em gânglios terminais nos feixes musculares e na camada adventícia, já as fibras simpáticas foram um plexo na camada adventícia, são responsáveis pela inervação dos vasos sanguíneos na parede, e as fibras sensitivas são aferentes do reflexo de micção (ROSS; PAWLINA, 2017).

2.2. Epidemiologia

O câncer de bexiga é o sexto tipo de câncer mais prevalente no mundo. Afeta em sua maioria homens com mais de 55 anos. Em 2018 a estimativa para cada 100 mil habitantes no Brasil foi de aproximadamente 10 mil novos casos sendo cerca de 7 mil em homens e 3 mil em mulheres. No Rio Grande do Sul foi realizada a estimativa para cada 100 mil habitantes dentre eles a estimativa prevê que ocorra em homens 580 novos casos enquanto para as mulheres 300 novos casos (CÂNCER DE BEXIGA | INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, [s.d.]).

Estima-se que para cada 100 mil homens residentes nos Estados de Goiás, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo, 7,82 – 9,20 são diagnosticados com câncer de bexiga musculo-invasivo (Figura 1). (CÂNCER DE BEXIGA | INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2017).

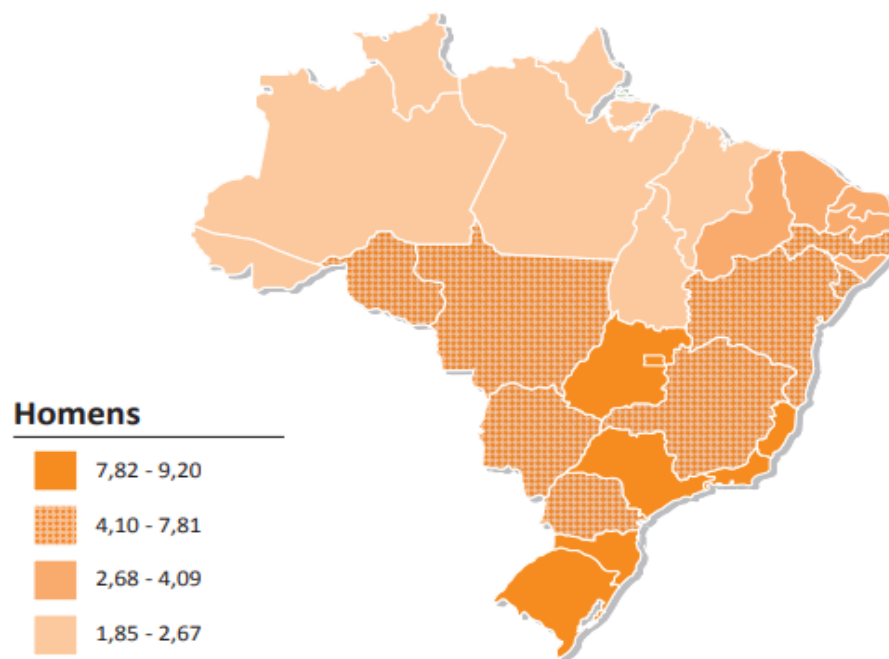


Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de câncer de bexiga maligno para 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018. Adaptado de Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância, (2017).

De acordo com o site *International Agency for Research on Cancer* da *World Health Organization*, foi estimado, para 2018, em todo o mundo, independente de sexo e idade, 199.922 mortes devido ao câncer de bexiga.

Devido a isso essa neoplasia ocupa o 13^o lugar no ranking mundial segundo ao *Global Cancer Observatory*, com maior taxa de mortalidade. A incidência dessa neoplasia é mais comum em homens brancos, mas quando se trata da mortalidade pessoas negras apresentam uma taxa de mortalidade similar a taxa de mortalidade em pessoas brancas, mesmo que o número de pessoas negras com essa neoplasia seja menor que pessoas brancas. Acredita-se que isto esteja relacionado a procura por ajuda médica e por um diagnóstico (PASHOS et al., 2002). A idade média para o diagnóstico desse tipo de câncer é de 73 anos (GIANNOPOULOU et al., 2019).

2.3. Tipos de câncer de bexiga

2.3.1. Câncer de bexiga não músculo-invasivo

São aqueles que ficam apenas nas células transicionais da bexiga sem atingir outros tecidos. Geralmente são os mais fáceis de tratar, mas apresentam uma taxa de recorrência para câncer de bexiga invasivo alta, uma vez que os pacientes com essa neoplasia voltam a ter o câncer após 5 anos (D’COSTA et al., 2016).

2.3.2. Câncer de bexiga musculo-invasivo

É o tipo que mais exige a retirada total da bexiga e o que possui maiores chances de apresentar metástases em outros órgãos. Geralmente pacientes que têm reincidência tendem a desenvolver o tipo invasivo do câncer. Os casos mais raros, os quais foram descritos acima, também possuem uma tendência a serem invasivos. Esse tipo também tende a um prognóstico ruim ao contrário do não invasivo. O câncer de bexiga invasivo acarreta outros problemas, uma vez que o tratamento quase sempre consiste em uma ressecção parcial ou total da bexiga, além de exigir que sejam realizados testes de diagnósticos periodicamente para acompanhamento do estadiamento desta neoplasia, sendo esses invasivos para o paciente (COHEN, 2010).

2.3.3. Carcinomas papilares

São aqueles que crescem em direção ao centro da bexiga, podem ser invasivos ou não invasivos. Os carcinomas papilares são protuberâncias originadas de uma superfície plana, sendo esses os não invasivos (Figura 2.a). Quando um carcinoma papilar se torna invasivo ele invade a camada muscular da bexiga, mas geralmente mais raros e ocorrem em pessoas mais jovens (CALAIS; SILVA; OLIVEIRA, 2010).

2.3.4. Carcinomas Planos

Ao contrário dos carcinomas papilares, o carcinoma plano ou carcinoma *in situ* como também é conhecido, cresce apenas na parede da bexiga (Figura 2.b) A maioria desses carcinomas é caracterizado como invasivo, apresenta falta de coesão celular o que permite que essas células sejam expelidas na urina (NEOPLASIAS UROTELIAIS - PATHOLOGIKA, 2018).

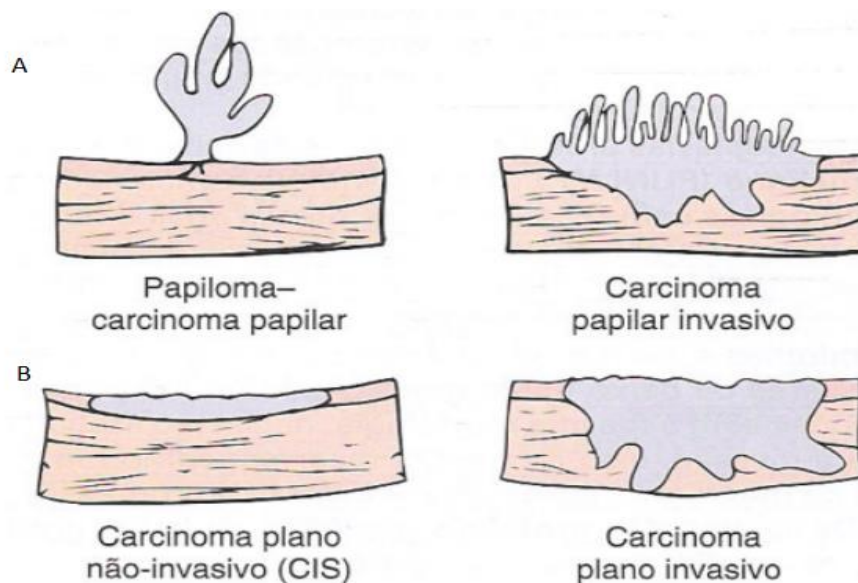


Figura 2. Padrões morfológicos. Carcinoma Papilar (A). Carcinoma plano (B). Adaptada de (FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO, 2007).

2.4. Subtipos histológicos de câncer de bexiga

2.4.1. Carcinoma urotelial

Cerca de 70% a 80% dos casos de câncer de bexiga são do tipo carcinoma urotelial, também conhecido como carcinoma de células de transição as quais acomete as células uroteliais da bexiga. Cerca de 80% desses pacientes apresentam hematúria como sintoma inicial a qual pode ser intensa ou moderada e normalmente não causa dor. Pode apresentar extensão local para dentro da camada muscular ou ainda pode ter extensão progressiva que pode atingir o sistema vascular e linfático o que pode colaborar para a disseminação do câncer para outros órgãos. Geralmente os sítios de metástase mais atingidos são os pulmões, ossos, cérebro e fígado (NEWHOUSE et al., 2001).

2.4.2. Carcinoma de células escamosas

Atinge apenas 1% a 2% dos casos de câncer de bexiga, é iniciado nas células planas e delgadas da bexiga geralmente após um longo período de irritação. A maioria desse tipo de câncer é caracterizado como invasivo (SHOKEIR, 2004).

2.4.3. Adenocarcinoma

O adenocarcinoma também é um tipo de câncer de bexiga geralmente invasivo que atinge cerca de 1% dos casos. Recebe esse nome porque inicia nas células glandulares da bexiga, da mesma forma que o carcinoma de células escamosas, esse tipo de neoplasia aparece após períodos prolongados de irritação na área (TIPOS DE CÂNCER DE BEXIGA - INSTITUTO ONCOGUIA, [s.d.]).

2.4.4. Carcinoma sarcomatóide

Esse tipo de câncer é uma variante extremamente rara do carcinoma de células transicionais a qual atinge apenas 0,3% dos casos de câncer de bexiga.

Originado nas células epiteliais e células provenientes do tecido mesenquimal pouco diferenciado ou células fusiformes. Assim como os demais tipos menos comuns também é um câncer invasivo e que apresenta uma taxa de crescimento rápido e agressivo onde os pacientes diagnosticados com essa neoplasia apresentam um prognóstico ruim (SCHLITTLER et al., 2012).

2.4.5. Carcinoma de pequenas células

Atinge menos de 1% dos casos e se origina nas células neuroendócrinas da bexiga. Possui um crescimento rápido e é altamente agressivo. Geralmente esse subtipo histológico é comum em outros tipos de câncer como o de pulmão. Devido a sua raridade e agressividade, o tratamento é complicado de ser realizado e as chances de metástase são maiores e ocorrem mais rapidamente nesse tipo de câncer de bexiga (CALADO et al., 2015).

2.5. Classificação de tumores

A classificação dos tumores de bexiga é dada de acordo com o sistema TNM de 2009 que classifica o estadiamento do tumor e a graduação histológica que apresenta o grau do tumor.

2.5.1. Classificação de estadiamento TNM

O estadiamento tem o objetivo de caracterizar o tumor como superficial ou invasivo, sua extensão loco-regional ou metastática (Figura 2). O tumor primário (T) é a categoria que se refere ao tamanho do tumor, profundidade e a invasão de outros tecidos. A classificação é avaliada de acordo com as seguintes siglas:

- Tx: refere-se ao tumor que não pode ser avaliado;
- T0: refere-se que não há evidência de um tumor primário;
- Ta: refere-se ao carcinoma papilar não invasivo;
- Tis: refere-se ao carcinoma *in situ*, ou seja, que está ocorrendo desenvolvimento de células cancerígenas apenas no tecido superficial;

- T1: refere-se ao tumor que invade a camada de tecido conjuntivo subepitelial;
- T2: refere-se ao tumor que invade a camada muscular;
 - T2a: refere-se ao tumor que invade a camada muscular superficialmente;
 - T2b: refere-se ao tumor que invade a camada muscular profundamente.
- T3: refere-se ao tumor que invade a camada muscular, gordura peripélvica ou o parênquima renal adjacente;
 - T3a: refere-se a invasão microscópica;
 - T3b: refere-se a invasão macroscópica.
- T4: refere-se ao tumor que invade órgãos adjacentes ou a gordura perirenal através do rim;
 - T4a: refere-se ao tumor que invade órgãos adjacentes, como próstata, útero ou vagina;
 - T4b: refere-se ao tumor que invade a parede pélvica e/ou a parede abdominal.

Os linfonodos regionais (N) é a categoria que avalia se o câncer se espalhou para os linfonodos vizinhos, onde:

- Nx: refere-se que não tem como avaliar os linfonodos regionais;
- N0: refere-se à ausência de metástase em linfonodos regionais;
- N1: refere-se a presença de metástase em um linfonodo de até 2 cm na sua dimensão;
- N2: refere-se a presença de metástase em um linfonodo maior que 2 cm, mas não superior a 5 cm na sua dimensão, ou ainda múltiplos linfonodos, porém nenhum com dimensão superior a 5 cm;
- N3: refere-se a metástase de um linfonodo com dimensão superior a 5 cm.

A metástases à distância (M) é a categoria que avalia se houve metástase, isto é, disseminação do câncer para outros tecidos longes do tecido de origem, que pode ser determinada por:

- Mx: refere-se a metástases que não podem ser acessadas;
- M0: refere-se à ausência de metástases à distância;

- M1: refere-se a presença de metástases à distância (ROUPRÊT et al., 2011).

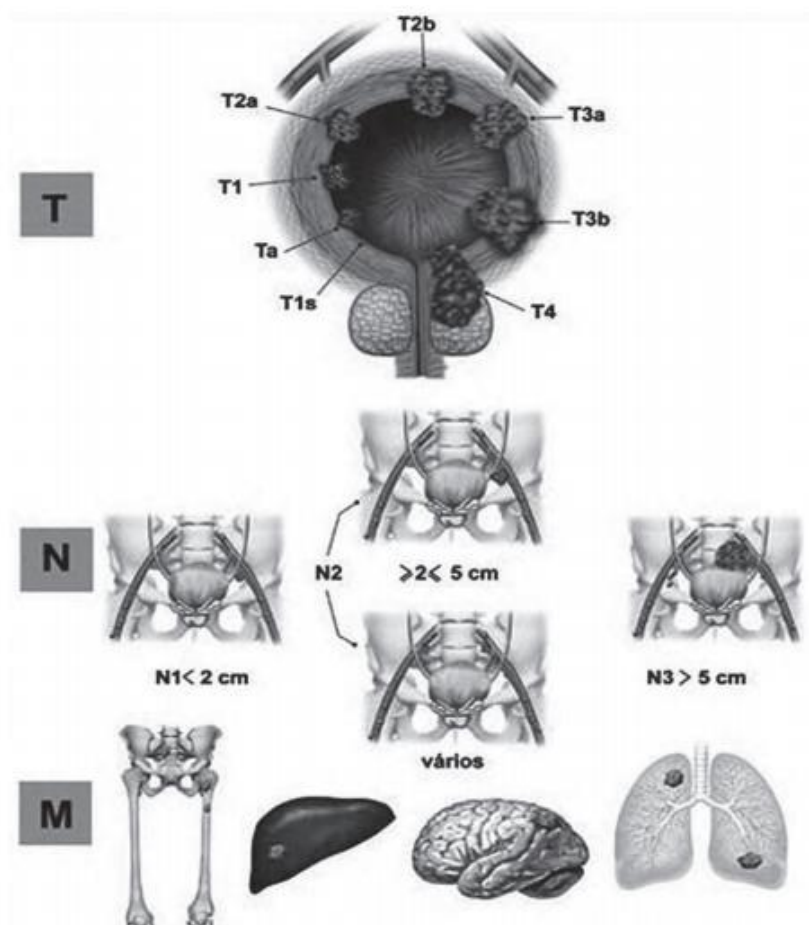


Figura 3. Estadiamento TNM do câncer de bexiga. (RETIRADO DE POMPEO AC, WROCLAWSKI ER, SADI MV. ALGORITMOS EM URO-ONCOLOGIA. ELSEVIER, 2007).

2.5.2. Classificação de graduação histológica

Tem como base avaliar o grau histológico para realizar uma correlação clínico-histológica. Em 1998 houve consenso entre a OMS/ISUP (*International Society of Urological Pathology*) que propôs a atual classificação com base na graduação histológica de 1973 (figura 3). A atual pode ser descrita:

- neoplasia urotelial de baixo potencial maligno (PUNLMP);
- baixo grau;
- alto grau (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA E SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA, 2006).

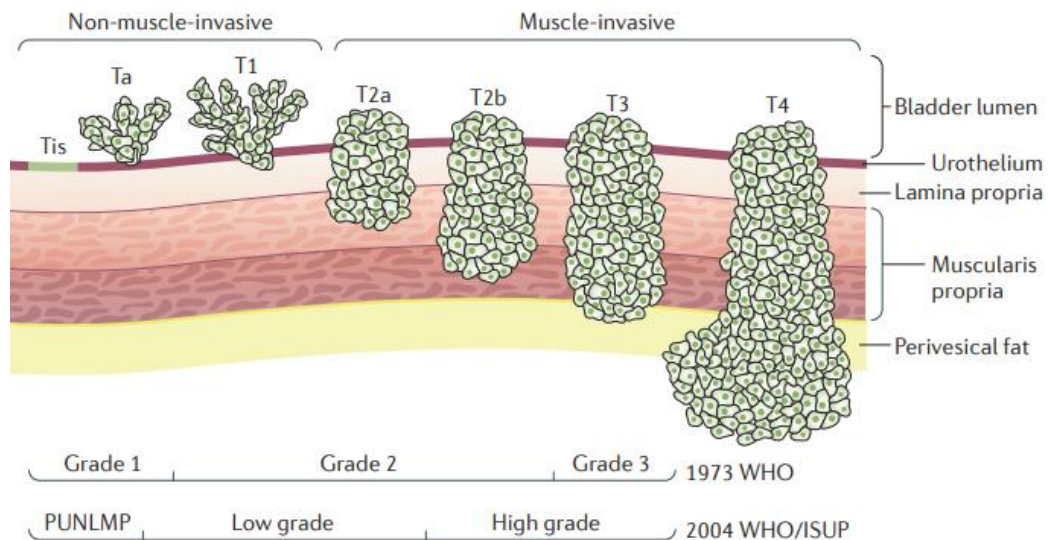


Figura 4. Tipos e estágios do câncer de bexiga. Geralmente se origina no urotélio da bexiga. Tumores papilares podem ser classificados como Ta e T1. Os carcinomas *in situ* (TIS) está confinado na mucosa. Os tumores T2 invadem a camada muscular de maneira superficial (T2a) ou profunda (T2b). Tumores T3 invadem a camada muscular e a gordura perivesical que pode ser microscópica (T3a) ou macroscópica (T3b). Os tumores T4, invadem outros órgãos vizinhos. Em 1973 a WHO considerava o grau histológico em 3 níveis (grade 1, grade 2, grade 3), a partir de 2004 foi realizada uma atualização onde a classificação prevê avaliar o grau de invasibilidade do tumor, sendo então dada pelas categorias PUNLMP, baixo risco e alto risco. Adaptada de SANLI *et al.*, (2017).

2.6. Fatores de risco

Entre os fatores de risco dessa neoplasia inclui-se o tabagismo como principal fator, o tabagismo, sexo, etnia, idade e exposição a produtos químicos e inflamações crônicas. O tabagismo é o maior fator de risco associado a essa neoplasia, acredita-se a estar ligado com a quantidade do consumo, duração de anos e idade em que a pessoa começou a fumar, auxiliam no aumento das chances. Cerca de dois terços dos casos em homens é ocasionado devido ao hábito de fumar enquanto para mulheres essa taxa corresponde a um terço dos casos (FARLING, 2017). A exposição ocupacional e produtos químicos como tintas, derivados de petróleo, corantes, borrachas apresentam mais chances de desenvolver essa neoplasia. É importante levar em consideração o modo de vida desse paciente, bem como o tempo de exposição aos produtos químicos e/ou alimentos e água contaminados e idade, já que são fatores que colaboram para

o desenvolvimento do câncer de bexiga (SANLI et al., 2017). O uso do medicamento pioglitazona, pertencente à classe das tiazolidinedionas, é usado para o tratamento de diabetes mellitus tipo dois e está associado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de bexiga. Acredita-se que as ações inibidoras de crescimento atribuídas aos efeitos nos alvos do receptor gama ativado por proliferador de tiazolidinediona (AZOULAY et al., 2012). A maior parte dos pacientes diagnosticados com essa neoplasia são homens brancos, na faixa etária de 60 - 69 anos. Normalmente regiões mais bem desenvolvidas apresentam uma incidência maior desse tipo de câncer do que regiões subdesenvolvidas. Não existe uma causa certa do porque isso ocorre, mas tem sido atribuído aos fatores de risco como o tabagismo, status socioeconômico, estilo de vida e busca por ajuda médica (BURGER et al., 2013). Inflamações ocasionadas por traumas físicos do urotélio, instrumentação e cálculos na bexiga aumentam o risco de malignidade. O parasita *Shistosoma haematobium* que é responsável pela proliferação da esquistossomose em países da África e Oriente médio, está associado também ao desenvolvimento de câncer de bexiga, principalmente nesses países mais subdesenvolvidos (SANTOS et al., 2012).

2.7. Biologia molecular do câncer de bexiga

Mutações ocasionadas pelos fatores de risco em especial o tabagismo e a exposição a produtos químicos, colabora para o desenvolvimento do câncer de bexiga. Em estudos realizados com modelos de camundongos foi possível estudar duas vias distintas para o surgimento do câncer invasivo e não invasivo (Figura 4). Essas duas vias decorrem de mutações específicas, isto é mutações no gene *FGFR3* estão associadas ao desenvolvimento de câncer de bexiga não musculo-invasivo, enquanto a via do câncer de bexiga musculo-invasivo é decorrente de mutações no gene *TP53* e instabilidade genômica (MCCONKEY; CHOI, 2018). Os genes como *FGFR3*, *RB1*, *Hras*, *TP53* e *TSC1*, desempenham função importante para a regulação da divisão celular, quando um deles sofre mutação o funcionamento da célula fica descoordenado o que colabora para o desenvolvimento da proliferação de células cancerígenas (ZHANG; ZHANG, 2015). Nos camundongos a baixa expressão do oncogene *Hras* dá origem a lesões hiperplásicas *in situ* ou papilares e o alto nível leva a formação de um

câncer não invasivo, o que é similar ao que ocorre nos humanos. Duas alterações são comuns no câncer não musculo-invasivo que incluem a exclusão do cromossomo 9 e uma mutação no gene *FGFR3*. Algumas análises feitas mostram que ocorrem deleções nos braços cromossômicos 10q, 11p, 11q, 17p, 18q, 19p e 19q em aproximadamente 20% dos casos. A mutação no gene *FGFR3* ativa a via da proteína-cinase ativada por mitógeno (*MAPK*) e a um fenótipo de célula com crescimento excessivo, que contribui para a hiperplasia precoce. Mutações que inativam o complexo da coesina do gene supressor de tumor *STAG2* também são características do desenvolvimento dessa neoplasia. O câncer não invasivo e de baixo grau pode vir a se tornar um câncer invasivo. Isto está relacionado a perda de função do locus *CDKN2A* que codifica *p16* e *p14ARF* que são reguladores das vias RB e p53. No câncer invasivo ocorre a inativação de genes supressores do tumor como *Trp53*, *Rb1* e *Pten* que precedem o desenvolvimento de displasia urotelial planas e carcinomas *in situ*, que favorecem a proliferação celular incluindo mutações no gene *TP53*, assim como a perda de expressão dos genes *CK20*, *HER2* e *Pten*, compartilham concomitantemente a via de fosfatidilinositol 3 quinase (*PIK3*) (SANLI et al., 2017).

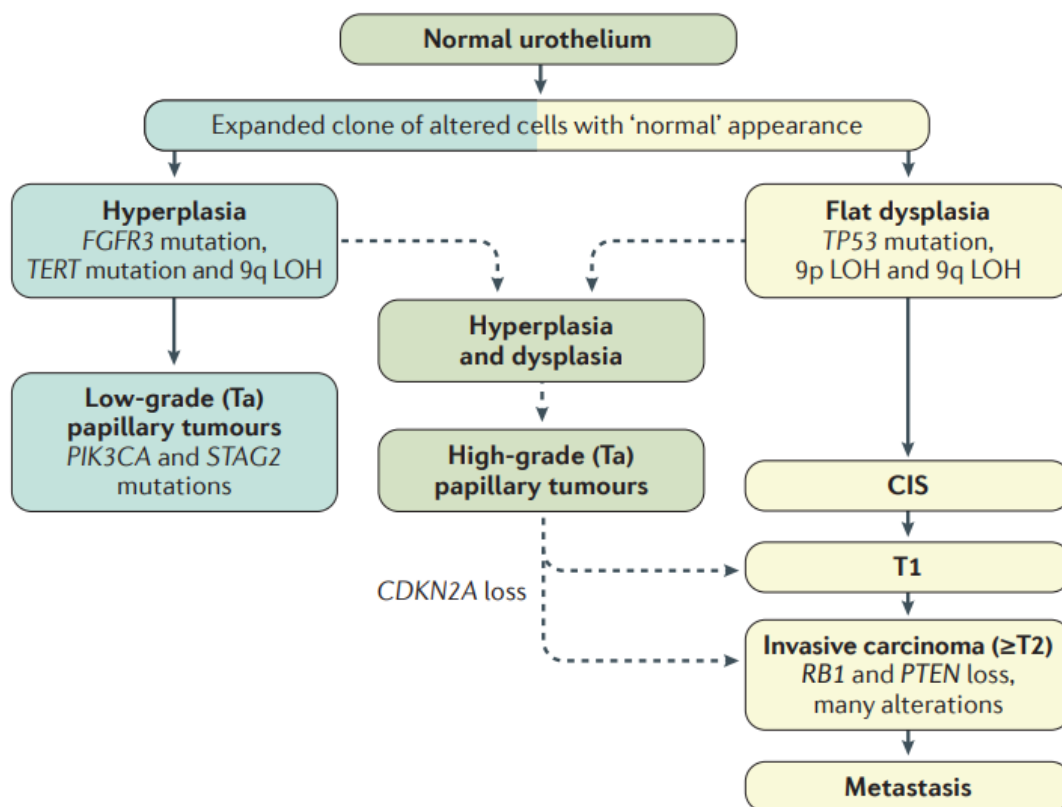


Figura 5. Caminhos da patogênese. Tumores papilares de baixo grau podem surgir por meio da hiperplasia e displasia e são categorizadas de acordo com a perda da heterozigidade do cromossomo 9 (LOH) e algumas mutações que ativam os genes que codificam *FGFR3*, transcriptase reversa (*TERT*), fosfatidilinositol isoforma alfa da subunidade catalítica 4,5-bifosfato 3-quinase (*PICK3CA*) e inativação das mutações em *STAG2* que codifica a subunidade de coesão SA-2 que colabora para crescimento, proliferação e divisão do tumor. Já os tumores invasivos parecem através de displasia plana e carcinomas *in situ* (CIS) que normalmente sofrem mutações no gene *TP53* e em LOH, porém não apresentam mutações no gene *FGFR3*. Os cânceres não invasivos e de baixo grau podem acabar progredindo para cânceres invasivos devido à perda de *CDKN2A*. Adaptado de (SANLI, 2017).

A superexpressão do gene *STK15* é associado com aneuploidia e transformação em células e a ativação de um oncogene que está envolvido na ampliação do centrômero, isto somado a fatores clínicos está relacionado a agressividade do tumor (AMORIM, 2011).

O projeto TCGA produziu um catálogo com as alterações de DNA em uma coorte de 400 para câncer de bexiga muscular-invasivo, esse projeto utiliza ferramentas de bioinformática para criar banco de dados com os resultados obtidos. Através desse projeto é possível explorar mutações genéticas em câncer e por meio dela foi capaz desenvolver diferentes abordagens para analisar esses dados. Por meio disso foram descobertas mutações como mutações nos genes *APOBEC3B* que se mostrou que sua função pode estar mais ativa em pacientes com câncer de bexiga, que por sua vez promovem a formação de outros erros no DNA de fita única que se formar durante o processo de reparo (CHOI et al., 2017).

Análises de expressão genica mostraram que mutações na histona *H3K27* desmetilase *KDM6A* são frequente encontradas em câncer de bexiga não musculo-invaso, e para câncer de bexiga musculo-invasivo foi visto que mutações na histona de *H3K4* metiltransferase *MLL2* foi mais frequente (GUI et al., 2011).

2.8. Sintomatologia

Os sintomas do câncer de bexiga são similares aos de outros problemas no trato urinário. Geralmente consistem em hematúria macroscópica ou

microscópica a qual pode ser contínua ou esporádica. Mudanças nos hábitos urinários como dificuldade de urinar, incontinência urinária, aumento na frequência e diminuição da quantidade de urina, dor ao urinar, estes sintomas são apresentados por cerca de 20% dos pacientes com câncer de bexiga. Pacientes que possuem metástases ou a doença muito avançada tendem a apresentar dor abdominal, óssea, flancos, caquexia, edemas, insuficiência renal e outros problemas que variam de acordo com a localização dos focos da metástase (PASHOS et al., 2002). (DEGEORGE; HOLT; HODGES, 2017).

2.9. Diagnóstico em câncer de bexiga

O diagnóstico dessa neoplasia consiste em avaliação dos sintomas e histórico clínico. Os exames realizados para a detecção desse tipo de câncer são exames físicos, citologia da urina, exames de urina, biópsia, exames de imagem, marcadores tumorais e cistoscopia. O padrão ouro para o diagnóstico de câncer de bexiga é a cistoscopia, um teste extremamente invasivo, caro de ser realizado e exige mão de obra treinada. Nos dias atuais existem pesquisas feitas para desenvolver biomarcadores encontrados na urina que apresentem a mesma confiabilidade do teste de cistoscopia. Atualmente existem alguns marcadores tumorais que são utilizados, mas ainda exigem a confirmação com o teste de cistoscopia (MATULEWICZ; DELANCEY; MEEKS, 2017).

2.9.1. Citologia, cultura e exame de urina

A citologia de urina é realizada para ver se existe a presença de células pré-cancerígenas ou cancerígenas, porém não apresentam uma confiabilidade muito alta já que a pessoa pode ter câncer, mas não necessariamente apresentar essas células na urina. A cultura é um exame realizado para descartar infecções urinárias, já que os sintomas de infecção e câncer de bexiga são similares. O exame de urina é feito para detectar a presença de alguma substância ou sangue que esteja presente na urina (EXAMES DE LABORATÓRIO PARA CÂNCER DE BEXIGA - INSTITUTO ONCOGUIA, 2018).

2.9.2. Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são usados para detectar substâncias específicas liberadas pelas células cancerígenas. Atualmente estudos na área procuram promover novos marcadores tumorais para câncer de bexiga, mas por enquanto no mercado existem apenas quatro tipos diferentes de marcadores moleculares. Que infelizmente não possuem uma boa aceitação pela comunidade médica por não apresentar a mesma confiabilidade do teste de cistoscopia.

- **UroVysion:** usado para vigilância de pacientes já diagnosticados com câncer de bexiga, é capaz de ser positivo ou negativo com base em análises cromossômicas e morfológicas existentes que para a identificação são necessários pelo menos 2 cromossomos 3, 7 ou 17. Apresenta uma especificidade maior quando comparada ao exame de citologia, principalmente em tumores de alto grau. Porém existem resultados falsos-negativos que podem ser explicados pela tetraploidia no ensaio uFISH (LAVERY et al., 2017).
- **BTA:** é um teste de aglutinação em látex capaz de detectar complexos de degradação da membrana basal. O BTASTat que é uma variação do teste é usado para vigilância porém necessita do auxílio da cistoscopia pois apresenta uma especificidade e sensibilidade mediana, e pode apresentar falso-positivo em mais de 25% dos casos, se baseia em detectar a presença da proteína relacionada ao fator H do complemento na urina, a qual é produzida por células do câncer de bexiga, que tem a mesma função da proteína do fator H do complemento humano responsável pela proteção de células que ativam o sistema complemento (VILLICANA et al., 2009).
- **Immunocyt:** é um anticorpo monoclonal imunofluorescente triplo associado a carcinoma urotelial, é melhor ser usados em conjunto com cistoscopia (HE et al., 2016).
- **NMP22 Bladdercheck:** faz a busca pela proteína NMP22, que é uma proteína responsável pela distribuição da cromatina em células filhas

durante a mitose, em pacientes com câncer de bexiga pode estar 25x acima do normal (O'SULLIVAN et al., 2012).

2.9.3. Cistoscopia

A cistoscopia é o teste de diagnóstico considerado o padrão ouro. Apresenta uma alta confiabilidade, mas tem seus pontos negativos como ser um exame invasivo, que exige mão de obra treinada e possui um alto custo. Esses fatores são um problema para países que apresentam sistema de saúde pública e para pacientes que necessitam pagar pelo exame, já que é um exame essencial para o rastreamento dessa neoplasia (CISTOSCOPIA PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE BEXIGA - INSTITUTO ONCOGUIA, 2018).

O exame é realizado com o paciente em posição ginecológica para ser mais fácil, em seguida é inserido um tubo de fibra óptica flexível ou rígido na uretra até chegar na bexiga (Figura 5). Para os homens é mais desconfortável uma vez que o tamanho da uretra é maior do que a da mulher (MATULEWICZ; DELANCEY; MEEKS, 2017).

Esses exames apresentam alguns riscos como infecções do trato urinário, sangramentos e traumas vesical e uretral. Normalmente é realizado sob anestesia local, mas pode ocorrer de ser feito com anestesia geral (FIGLER, 2017).

Esse teste também é usado para realizar o rastreamento da doença, visto a sobrevida em 5 anos chega em torno de 83%, sendo indicado sempre acompanhamento médico e exames periódicos para rastreamento de novos focos de câncer e exames para verificar se existe metástases em outros órgãos (GLINA et al., 2008).

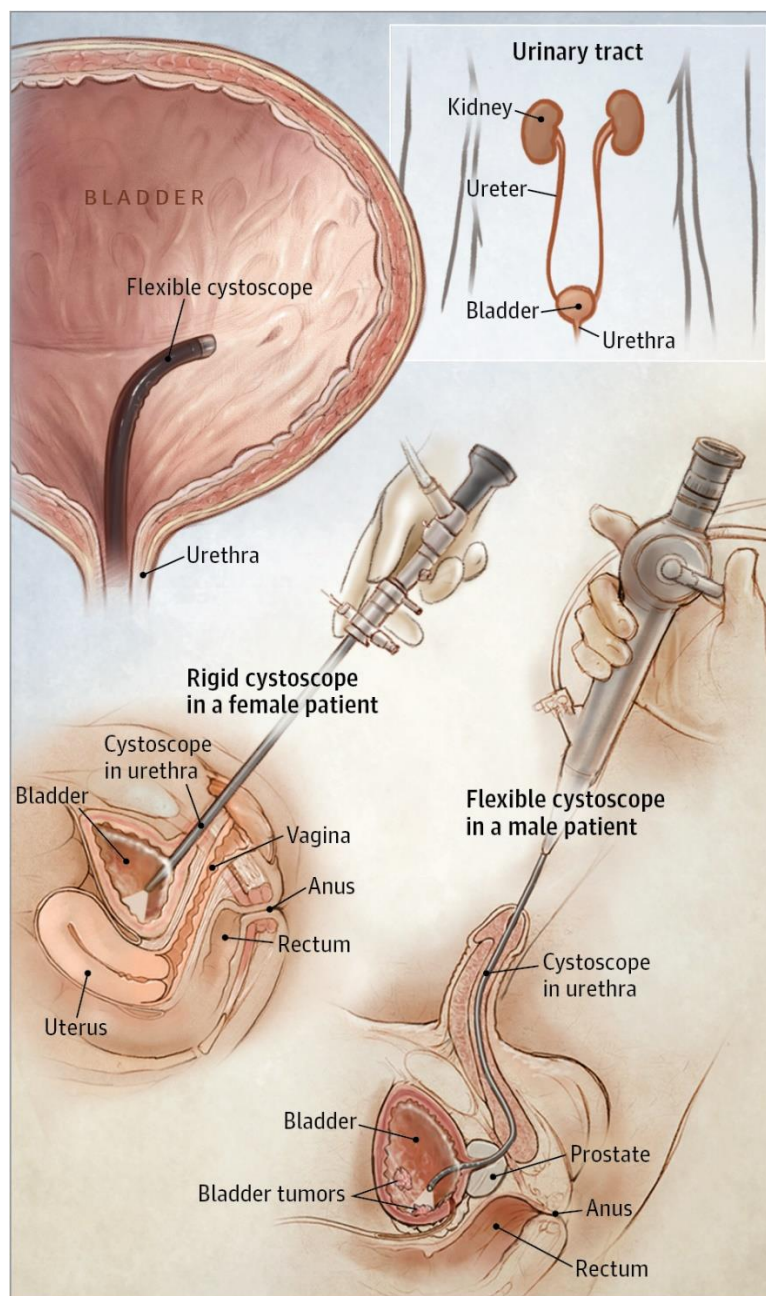


Figura 6. Esquema do exame de cistoscopia sendo realizado em mulher e homem. (MATULEWICZ; DELANCEY; MEEKS, 2017)

2.10. Tratamento

Dentro do tratamento desta neoplasia existem diferentes metodologias, como o tratamento cirúrgico e o tratamento por meio de terapias, que incluem quimioterapia, radioterapia e imunoterapia.

2.10.1. Tratamento cirúrgico

O tratamento cirúrgico consiste na ressecção transuretral que é feito por meio do citoscópio normalmente é o tratamento usado em pacientes que apresentam a forma não invasiva da doença (TRATAMENTO DO CANCRO DA BEXIGA | CUF, 2017).

Já a cistectomia parcial, é usada em pacientes que possuem o câncer de bexiga invasivo mas não tão avançado e consiste na retirada apenas do tumor, mantendo então o restante da bexiga (IBORRA et al., 2009). Diferente da cistectomia radical que retira totalmente a bexiga do paciente e é utilizada para aqueles que apresentam a forma mais agressiva da doença. Por meio da cistectomia radical, além do paciente ter a retirada total da bexiga os homens também sofrem a retirada das vesículas seminais e da próstata, enquanto das mulheres perdem parte da vagina, colo do útero, ovários e o útero (GLINA et al., 2008).

2.10.2. Quimioterapia e radioterapia

Pode ser administrada de duas formas diferentes, pela via sistêmica ou pela via intravesical, o qual pode ser inserido diretamente pela uretra até o local do tumor. A quimioterapia, seja ela qual for, pode trazer efeitos colaterais como náuseas e vômitos, perda de apetite e cabelo, inflamações na boca, diminuição de glóbulos brancos, sangramentos, fadiga e outros (POMPEO et al., 2008).

A radioterapia é indicada para pacientes que não podem realizar a cirurgia devido a localização e tamanho do tumor e para aqueles que apresentam a doença na fase inicial (STENZL et al., 2012). O uso dessas duas terapias juntas é mais eficaz por atacar diretamente as células cancerígenas.

2.10.3. Imunoterapia

É realizada para auxiliar o sistema imunológico, existem alguns tipos. Um desses tipos é a BCG intravesical que é empregada através da uretra diretamente na bexiga onde ativa as células da mucosa. Essa terapia não é eficaz em pacientes com câncer invasivo, visto que a imunoterapia visa auxiliar

o sistema imune a atacar as células cancerígenas superficiais do urotélio. Além disso, pode ser usada após a ressecção transuretral do tumor a fim de evitar a recidiva da doença (RATLIFF et al., 1993).

Existem também inibidores do controle imunológico que tem como alvo os pontos de controle das células, com o propósito de restabelecer a atividade das células do sistema imune no combate às células cancerígenas. Alguns inanticorpos desenvolvidos para esse fim são o atezolizumabe, durvalumabe e avelumabe. Esses anticorpos têm como alvo a proteína PD-L1 que auxilia as células cancerígenas a evitar o ataque do sistema imunológico. O bloqueio dessa proteína ajuda o sistema imunológico aumentar a resposta e os ataques as células cancerígenas, assim retardando o crescimento dos tumores (JORGE, 2019).

Já os anticorpos nivolumabe e pembrolizumabe atacam a proteína PD-1. Essa proteína auxilia o sistema imune agir no bloqueio dessa proteína ajuda o sistema imune a atacar as células cancerígenas. Esses medicamentos podem ser usados para retardar o câncer invasivo. Dentre os efeitos colaterais dos quimioterápicos são similares aos efeitos da quimio e radioterapia (ARRUDA; VIANI, 2017).

2.11. Bioinformática

A bioinformática é uma área da biologia que tem crescido muito nos últimos anos. Abrange diferentes áreas e vem cada vez mais colaborando para o desenvolvimento de fármacos, diagnóstico e descobrimento de genes. Por meio da bioinformática é possível modelar proteínas, fazer predição gênica, dinâmica molecular, alinhamento de sequências, estudos de filogenia entre outras aplicações. Na saúde, a bioinformática por meio da predição de função gênica e da modelagem estrutural de proteínas, é possível identificar sítios de ligações de antígenos, de proteínas e outras substâncias. Além de ser possível descobrir novas alterações genéticas que acarretam doenças e colaboram para o aumento dos bancos de dados genéticos e biológicos (BIOINFORMÁTICA: DA BIOLOGIA À FLEXIBILIDADE MOLECULARES | BIOINFO | GRUPO DE BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL DA UFRGS, 2014).

Devido ao sequenciamento, alterações genéticas em doenças como câncer, estão sendo descobertas, que por sua vez corrobora para a descoberta de novos alvos terapêuticos e achados de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico. Como o câncer de bexiga possui alguns subtipos o uso de ferramentas de sequenciamento é essencial para facilitar a pesquisa na área, visto que cada um dos subtipos apresentam assinaturas moleculares distintas (REFUBIUM - BIOINFORMATICS MODELING OF PROTEOMICS CHANGES IN MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER, 2016).

2.11.1. Projeto TCGA

Esse projeto utiliza ferramentas de bioinformática para criar banco de dados com os resultados obtidos. Através desse projeto é possível explorar mutações genéticas em câncer e por meio dela foi capaz desenvolver diferentes abordagens para analisar esses dados (Tabela 1). Esse projeto tem o objetivo de catalogar alterações genômicas em mais de 30 tipos diferentes de tumores humanos por meio do sequenciamento de genoma em larga escala. (TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015)

Tabela 1. Referente as ferramentas de bioinformática desenvolvidas para analisar dados biológicos de mutações genômicas em câncer.

Ferramenta	Função	Referência
TCIA	Fornecer acesso a conjuntos de imagens radiológicas no formato DICOM. Suporta a pesquisa de fenótipo-genótipo de imagem	(COMMEAN et al., 2015)
TCPA	Portal de dados interativos para acessar, visualizar e analisar dados proteômicos	(CHEN et al., 2019)
cBioPortal	Permite analisar e realizar o download de dados genômicos de câncer em larga escala	(DENG et al., 2016)

Portal	Permite explorar alterações no número de cópias dos dados do projeto, incluindo resultados de análises GISTIC para identificar genes relacionados ao crescimento tumoral.	(MERMEL et al., 2011)
DeMixT	Software capaz de converter dados de transcriptoma de um ou mais componentes tumorais. Fornece as proporções dos componentes e níveis de expressão	(WANG et al., 2018)
FASMIC	Plataforma web analítica integradora para anotar genes funcionais de mutações somáticas	(NG et al., 2018)
Firehose	Conjunto de ferramentas e pipelines que processam e analisam dados genômicos e proteômicos em larga escala	(SAMUR, 2014)
Firebrowse	Permite explorar e visualizar dados de câncer gerados pelo Broad GDAC Firehose, que fornece ferramenta gráfica como viewGene para analisar níveis de expressão	(DENG et al., 2017)
FunSeq2	Faz anotação de variações somáticas de variantes não codificantes	(FU et al., 2014)
Integrative Genomics Viewer	Permite visualizar com uma alta qualidade a exploração interativa de dados integrados	(ROBINSON et al., 2011)

MBatch	Ferramenta web para identificar e quantificar em lote presentes nos dados processados do projeto	(CHOI; HONG; WOO, 2017)
MuSE	Modela a evolução do alelo de referência para a composição alélica do tumor e do tecido normal	(FAN et al., 2016)
Regulome Explorer	Ferramentas interativas na web que visa visualizar e explorar associações entre dados clínicos e moleculares do projeto	(TOMCZAK; CZERWIŃSKA; WIZNEROWICZ, 2015)
SurvNet	Ferramentas interativas na web que visa identificar biomarcadores baseados em rede	(LI et al., 2012)
TANRIC	Servidor web que visa analisar lncRNAs em câncer	(LI et al., 2015)
TumorMap	Portal interativo para visualizar dados omics de alta dimensão. Por meio de testes estatísticos permite encontrar associações entre grupos de amostras e anotações de eventos clínicos, fenótipos e moleculares	(NEWTON et al., 2017)
Xena	Conjunto de ferramentas baseadas na web para visualizar, integrar e analisar a genômica do câncer e dados associados	(GOLDMAN et al., 2019)

2.11.2. Expressão gênica para estudo de câncer de bexiga

Para estudar a expressão gênica de câncer de bexiga é necessário comparar em células normais e os processos de expressão, para isso existem bancos de dados que podem ser encontrados em diferentes bancos de dados.

O mais utilizado está dentro do NCBI, que é uma plataforma que integra diferentes bancos de dados como o GEO que é um repositório de dados genômicos funcionais que suporta envios de dados compatíveis com MIAME. Oferece ferramentas curadas para que pesquisadores possam realizar download e consultar perfis de expressão genica (CERRONE et al., 2018). Através de análises de expressão genica é possível identificar genes e classificar e assim prosseguir para análises de função molecular, que podem ser analisadas por outras plataformas de bioinformática (XIAO; QIU, 2013).

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é prospectar *in silico* proteínas disponíveis na urina de humanos, as quais podem apresentar potencial biomarcador para diagnosticar câncer de bexiga do tipo invasivo.

3.2. Objetivos específicos

- Prospectar *in silico* proteínas com potencial biomarcador para câncer de bexiga;
- Identificar proteínas com potencial biomarcador para câncer invasivo;
- Obter as sequências;
- Análise de rotas metabólicas com a plataforma BlastKoala;
- Revisão de patentes;
- Análise de interações proteicas;
- Análise de domínios;
- Predição de estruturas 3D.

4. Material e Métodos

O resumo das abordagens metodológicas utilizadas (Figura 7), resume como foi realizada a prospecção das proteínas para câncer de bexiga, incluindo as filtragens para proteínas de câncer de bexiga do tipo invasivo, seguindo ainda de outras análises de bioinformática que serão descritas no decorrer desse trabalho.

4.1. Identificação de possíveis alvos na literatura

A busca por proteínas para câncer de bexiga foi feita através da plataforma NCBI – PubMed. O NCBI é um banco de dados biológicos com diferentes funções. Dentro dele é possível encontrar o PubMed, que é um banco de dados biomédicos, o qual foi usado para realizar a revisão bibliográfica e a obtenção das proteínas. Na barra de pesquisa, foi como palavras chaves “*Bladder cancer*”, “*bladder cancer biomarkers*”, “*bladder cancer diagnosis*” entre outras. Nessa primeira busca utilizou-se artigos mais antigos até artigos mais atuais. O único critério foi ser proteínas encontradas na urina, seja a proteína para câncer invasivo ou não invasivo.

4.2. Filtragem de proteínas para câncer de bexiga invasivo

A partir das proteínas encontradas por meio da literatura obtida do PubMed, foi realizada uma primeira filtragem dessas proteínas, afim de selecionar apenas proteínas encontradas em pacientes com câncer de bexiga do tipo invasivo. Para a realização dessa filtragem as proteínas relatadas na literatura como potenciais biomarcadores para câncer de bexiga de invasivo, foram selecionadas. Os critérios de seleção se basearam em artigos que relataram estudar essas proteínas. Para isso palavras chaves como “câncer de bexiga invasivo”; “Biomarcadores para câncer invasivo” foram sujeitas ao campo de pesquisa do PubMed e em seguida colocadas em uma tabela, junto com o nome, código de acesso e referência da mesma.

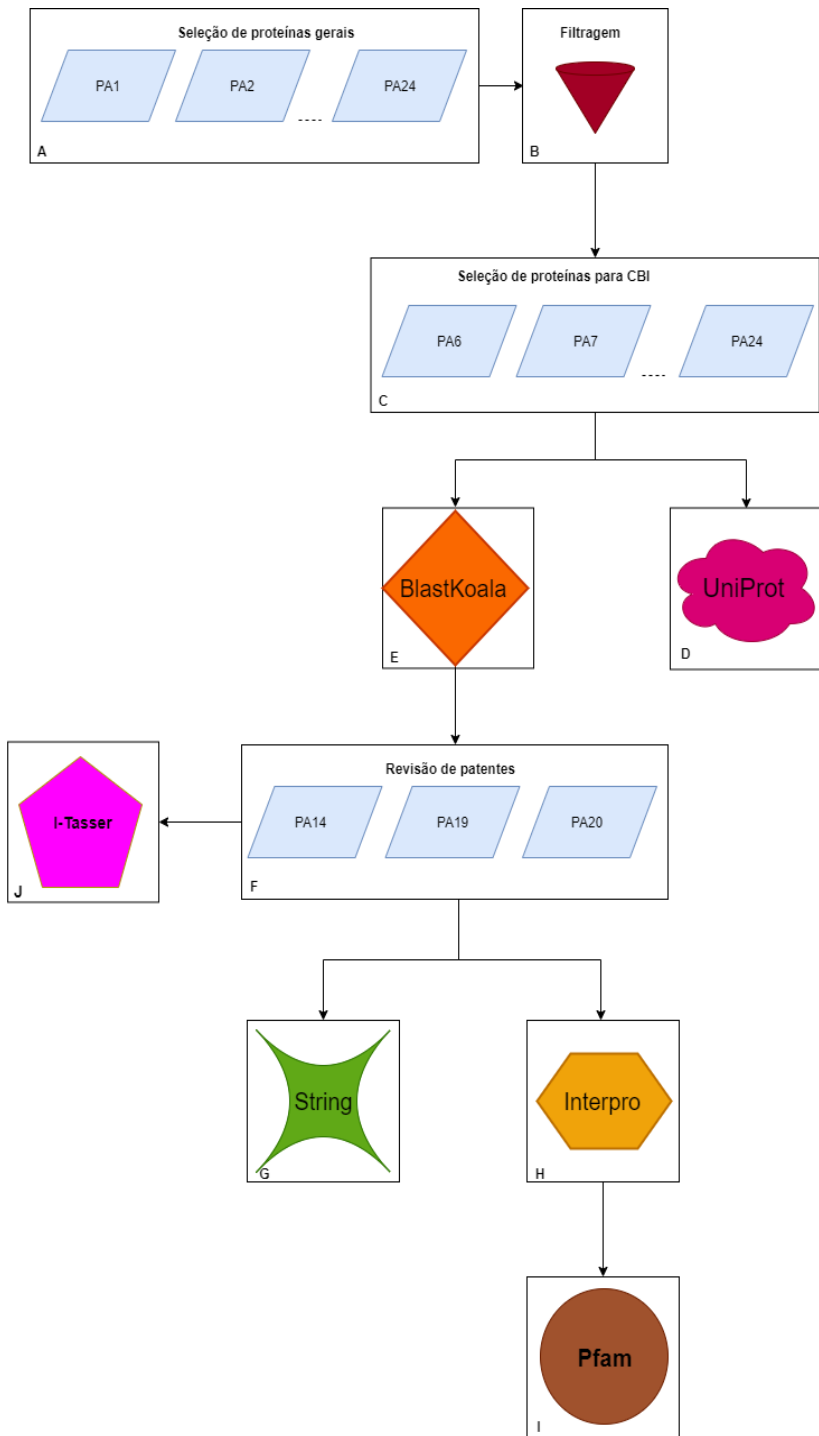


Figura 7. Resumo da metodologia utilizada neste trabalho. (A) Foi realizada uma busca na literatura através da plataforma do NCBI - PubMed por prováveis proteínas que possam ser utilizadas como potenciais alvos para biomarcadores de diagnóstico em câncer de bexiga. Foram encontradas proteínas gerais para o câncer de bexiga que pudessem ser encontradas na urina. (B) e (C) A seguir foi realizada uma filtragem das proteínas encontradas para que apresentassem potencial para serem biomarcadores para câncer de bexiga invasivo. (D) As sequências dessas proteínas de câncer de bexiga invasivo foram obtidas através do banco de dados UniProt. (E) Após enviadas e analisadas na plataforma BlastKoala. (F) Através dessa análise foi possível selecionar proteínas exclusivas para o tipo invasivo para as quais foi realizada uma revisão em

patentes pela plataforma do NCBI através da sequência destas proteínas. (G) A plataforma String foi usada para fornecer análises de interação dessas proteínas. (H) As sequências dos domínios foram baixadas no software Interpro. (I) E preditas através da plataforma PFam. (J) A estrutura das proteínas foi realizada por meio do software I-Tasser.

4.3. Obtenção das sequências das proteínas para câncer de bexiga musculo-invasivo

As sequências das proteínas selecionadas na filtragem para câncer de bexiga do tipo invasivo foram obtidas a partir do banco de dados UniProt (PUNDIR; MARTIN; O'DONOVAN, 2016) no formato .fasta. O UniProt é um banco de dados de proteínas, gratuito que fornece as sequências e funções de cada proteína, bem como outras informações como domínios, famílias, interações moleculares, localização celular dentre outras. O UniProt apresenta diferentes bancos de dados na plataforma, para obter as sequências alvos foi usado o banco de dados de conhecimento que é o UniProtKB. No campo de pesquisa foi colocado o nome da proteína alvo e em seguida era feito o download das proteínas que correspondem ao organismo *homo sapiens*.

4.4. Análises de rota metabólica

A plataforma do BlastKoala (KANEHISA; SATO; MORISHIMA, 2016) é um servidor de sequências de genomas e pangenomas, associado ao KO (Kegg Orthology) (KANEHISA et al., 2017) que caracteriza as funções genéticas e reconstruir caminhos, hierarquias e prever funções do organismo e/ou ecossistema. Esta plataforma foi usada para fazer uma nova filtragem das proteínas de câncer de bexiga invasivo. As sequências obtidas a partir do banco de dados UniProt foram submetidas na forma de arquivo FASTA na plataforma do BlastKoala. Para o campo do grupo taxonômico foi usado o “*taxonome ID*” 9606 que é referente a espécie *Homo sapiens*, encontrado através do banco de dados do NCBI. Já para o campo referente ao KEGG GENES, foi selecionada a opção “*genus_eukaryotes*”. Após os campos serem devidamente selecionados as proteínas foram submetidas, uma após a outra. Todas as proteínas submetidas utilizaram dos mesmos parâmetros. Após a chegada dos resultados o critério de seleção para filtrar as proteínas, se deu de maneira que o resultado

obtido correspondesse a função de doença humana específica para câncer de bexiga.

4.5. Revisão de patentes

A revisão de patentes foi realizada nas três proteínas selecionadas a partir das análises do BlastKoala. Para esta revisão foi usado o banco de dados de patentes (pataa) do Blast Protein que é um dos bancos de dados de alinhamento de sequências proteicas disponível no NCBI. As sequências usadas foram as mesmas obtidas através do banco de dados UniProt no formato FASTA. O banco de dados de patentes pataa foi selecionado no campo *database* e o algoritmo usado para realizar o alinhamento dessas proteínas foi o Blastp. Realizar o alinhamento dessas sequências permite encontrar o uso dessas proteínas em outros estudos que estejam sendo realizados com as mesmas. O critério de seleção para manter essas proteínas neste estudo foi essa proteína não estar sendo usada em nenhum outro estudo relacionado a diagnóstico e que esteja protegido com o termo de proteção intelectual. A busca pelas patentes está disponível em diferentes bancos de dados como:

- INPI – Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
- USPTO – *United States Patente and Trademark Office*
- WIPO – *World Intellectual Property Organization*
- EPO – *Europion Patente Office*
- JPO – *Japan Patent Office*

4.6. Análises de interações proteicas

A plataforma String (VON MERING et al., 2003), visa fornecer informações de interações diretas e indiretas entre essas proteínas. Essa plataforma utiliza uma estrutura de pontuação exclusiva, isto é, tem parâmetros de referências encontrados em diversas associações que são comum entre outros conjuntos de referências encontrados em diferentes bancos de dados. Pode fornecer uma precisão de pelo menos 80% para mais de interação entre as proteínas. Além de fornecer ainda informações de alto nível de ligação funcional das proteínas que por sua vez ajuda a facilitar as análises de modularidade em processos biológicos. Possui, 261.033 genes ortólogos em 89

genomas sequenciados, o que corrobora para o desenvolvimento da pesquisa e facilita a interpretação de dados. Devido a essas informações fornecidas pela plataforma, as proteínas alvo deste trabalho foram submetidas a uma busca na string. Para isso, no campo *name* o nome da proteína foi fornecido e o organismo foi selecionado como *homo sapiens*.

4.7. Obtenção de sequências dos domínios

O InterPro (MULDER; APWEILER, 2008) é um software online que fornece a classificação de sequências de proteínas, além de fornecer informações sobre os domínios e as famílias de interesse através do InterRS web que é um sistema de recuperação de sequência. Além de tudo o InterPro é uma das ferramentas que pode ser utilizada para realizar a anotação automática de novos genomas inteiros, que por sua vez colabora para a disseminação de informação (MCDOWALL; HUNTER, 2011). O InterPro foi utilizado para fornecer a sequência dos domínios em formato FASTA, para isso foi utilizado o código de acesso da proteína que é disponibilizado no banco de dados UniProt. O código foi inserido na barra “*by text*” na aba *search*, e após submetida para então salvar a sequência dos domínios no formato FASTA.

4.8. Análises de domínios com a ferramenta PFam

O software Pfam (FINN et al., 2014) é um banco de dados de famílias de proteínas, que contém 14.831 entradas curadas manualmente. O banco de dados usa como base os proteomas encontrados no UniProtKB (FINN et al., 2016). O Pfam foi usado para analisar os domínios de cada uma das proteínas. A análise foi realizada através do campo *sequence search* que busca os domínios através da sequência que neste caso foi obtida por meio do *software* InterPro. A análise por sequência visa encontrar matches correspondentes com os domínios disponíveis na plataforma. No campo *E-value* foi usado o parâmetro 1.0.

4.9. Predição de estruturas via I-Tasser

O software I-Tasser (ZHANG, 2008) é um preditor de estruturas 3D a partir das sequências de aminoácidos . Esse software foi utilizado para prever as

estruturas das proteínas alvos, porque as mesmas não foram encontradas na *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, 2000). Para prever a estrutura tridimensional dessas proteínas isso foi necessário utilizar o *e-mail* institucional da Universidade. As sequências em formato fasta foram submetidas uma de cada vez, devido ao tempo de espera para predição ser realizada e ainda porque o software não permite o envio de mais de uma sequência por vez. Para a escolha da melhor imagem gerada o critério foi o melhor *C-score* apresentado, visto que são retornados cinco tipos diferentes de estruturas nas extensões .pdb e .png.

5. Resultados

5.1. Busca por alvos em bancos de dados

A busca realizada na plataforma do NCBI forneceu 24 proteínas com potencial para serem biomarcadores para câncer de bexiga invasivo e não invasivo as quais foram denominadas como PA1, PA2 ... PA24.

5.2. Proteínas de câncer de bexiga musculo-invasivo

A partir da seleção das proteínas gerais para câncer de bexiga, foi realizada uma filtragem por meio da literatura para selecionar proteínas que apresentassem potencial para serem biomarcadores para câncer de bexiga invasivo, dentre as proteínas as 24 proteínas gerais, 10 delas foram selecionadas por apresentarem potencial biomarcador para câncer de bexiga invasivo as quais foram PA6, PA7, PA11, PA14, PA19, PA20, PA21, PA22, PA23 e PA24.

5.3. Análises de rotas metabólicas com o BlastKoala

As 10 proteínas selecionadas com potencial biomarcador para câncer de bexiga invasivo foram sujeitas a análises no software BlastKoala afim de mostrar onde essas proteínas interagem no organismo. Essa relação é demonstrada na Tabela 1. A análise resultou em 2 proteínas que apresentam função em doenças humanas e apresentam o subtipo para câncer de bexiga e uma delas que apresenta um complexo com outra proteína que se mostrou vantajoso como biomarcador de diagnóstico.

Tabela 1. Proteínas com potencial biomarcador para câncer de bexiga do tipo invasivo.

Proteína	Função
PA6	Sistemas Organizacionais - Sistema Imune

PA7	Sem informação disponível
PA11	Doença Humana - Doença Neurodegenerativa
PA14	Informação Ambiental - Transdução de sinal de processamento; Processos Celulares - Transporte e Catabolismo; crescimento celular e morte; Comunidade celular - Eucariotos; Motilidade celular; Sistema Organizacional - Sistema Endócrino - Desenvolvimento; Doenças humanas - visão geral do câncer - tipos específicos de câncer
PA19	Informação Ambiental - Transdução de sinal de processamento; Processos Celulares - Transporte e Catabolismo; crescimento celular e morte; Comunidade celular - Eucariotos; Motilidade celular; Sistema Organizacional - Sistema Endócrino - Desenvolvimento; Doenças humanas - visão geral do câncer - tipos específicos de câncer
PA20	Sistemas Organizacionais - via de sinalização IL-17
PA21	Doença Humana - Visão Geral do Câncer; Tipos específicos de câncer
PA22	Processamento de Informação Genética - Replicação e Reparo; Processamento de Informação Ambiental - Transdução de Sinal; Processamento celular - crescimento e morte celular; Doenças humanas - visão geral do câncer - doenças infecciosas virais - resistência a medicamentos antineoplásicos
PA23	Sem informação disponível
PA24	Sem informação disponível

5.4. Revisão de patentes

Na revisão das patentes nenhuma das proteínas PA14, PA19 e PA20, as quais são as sequências alvos deste trabalho apresentou similaridade com a

pesquisa de outros grupos ou que esteja protegida sobre patentes. A maior parte dessas proteínas é utilizada como biomarcador para outros tipos de cânceres ou como fármacos.

5.5. Análises de interação de rotas metabólicas com o String

As proteínas-alvo foram analisadas no software string o qual forneceu um resumo detalhado de artigos publicados com cada uma delas, análises de rotas metabólicas, domínios e as interações dessas proteínas com outras. As proteínas PA14, PA19 e PA20, apresentaram interações moleculares com outras proteínas, mas nenhuma delas apresentou interação entre si.

5.6. Análises de domínios com o Pfam

As análises de domínios das proteínas PA14, PA19 e PA20 foi realizada no software do Pfam, que permitiu comparar entre essas proteínas algum tipo de similaridade entre os domínios. Na Tabela 2 é possível avaliar as famílias desses domínios bem como a sua função.

Tabela 2. Análises de domínios Pfam para as três proteínas selecionadas nas etapas anteriores da pesquisa.

Proteína	Família	Descrição	Envelopamento	Alinhamento
PA14	PG_binding_1	Domínio de ligação a peptidoglicano putativo	38-94	41-94
	Peptidase M10	Matrixina	115-444	115-444
	fn2	Domínio de fibronectina tipo II	230-271	230-271
PA19	Recep L domain	Domínio L do receptor	57-168	57-167
	Furin-like	Região rica em cisteína semelhante à furina	177-338	185-338

	GF recep IV	Domínio receptor do fator de crescimento IV	505-637	505-636
	Pkinase Tyr	Proteína tirosina quinase	712-968	714-965
PA20	Lipocalin	família de proteínas de ligação a ácidos graxos citosólicos	48-193	48-190

5.7. Predição de estruturas por meio da plataforma I-Tasser

A cada proteína analisada na plataforma I-tasser foi gerado cinco imagens estruturais diferentes, tanto no formato .png quanto no formato .pdb. A seleção da melhor imagem foi baseada no *C-score* que é um algoritmo de confiabilidade que vai de -5 a 2, e quanto mais próximo de 2 o *C-score* for, melhor é a predição estrutural.

A estrutura predita através do I-Tasser das proteínas PA14 (figura 9), PA19 (figura 10) e PA20 (figura 11). A proteína PA14 apresentou um *score* de 0.38. A proteína PA19 teve um *score* de 2.44 e a proteína PA20 teve um *score* de 0.41.

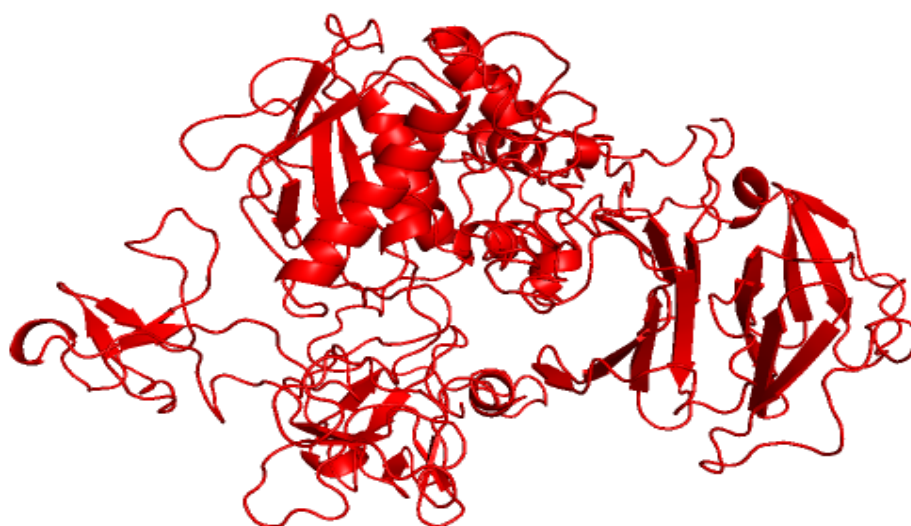


Figura 8. Estrutura predita no software I-Tasser da proteína PA14.

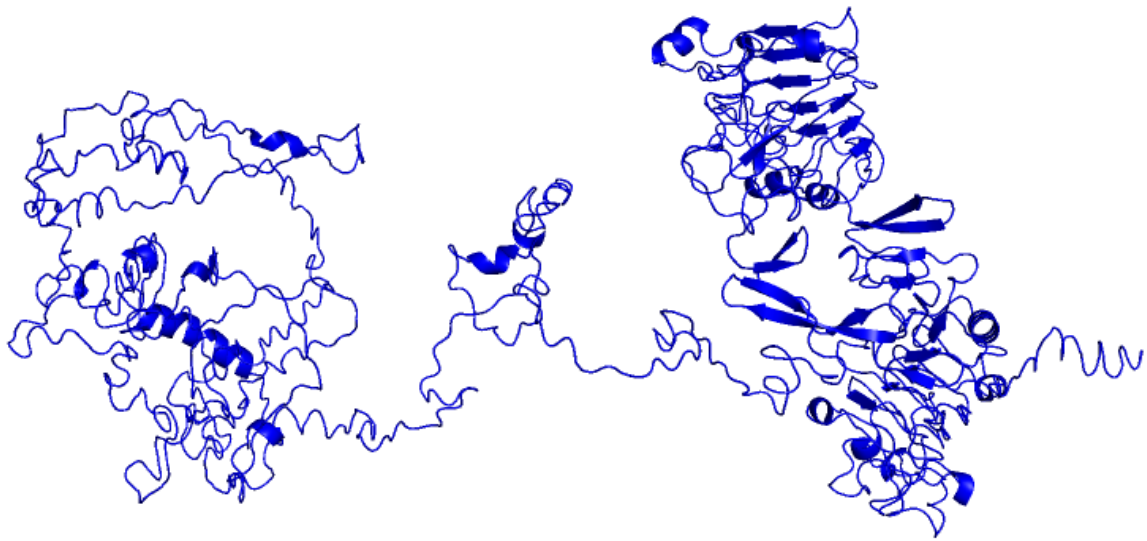


Figura 9. Estrutura predita no software I-Tasser da proteína PA19.

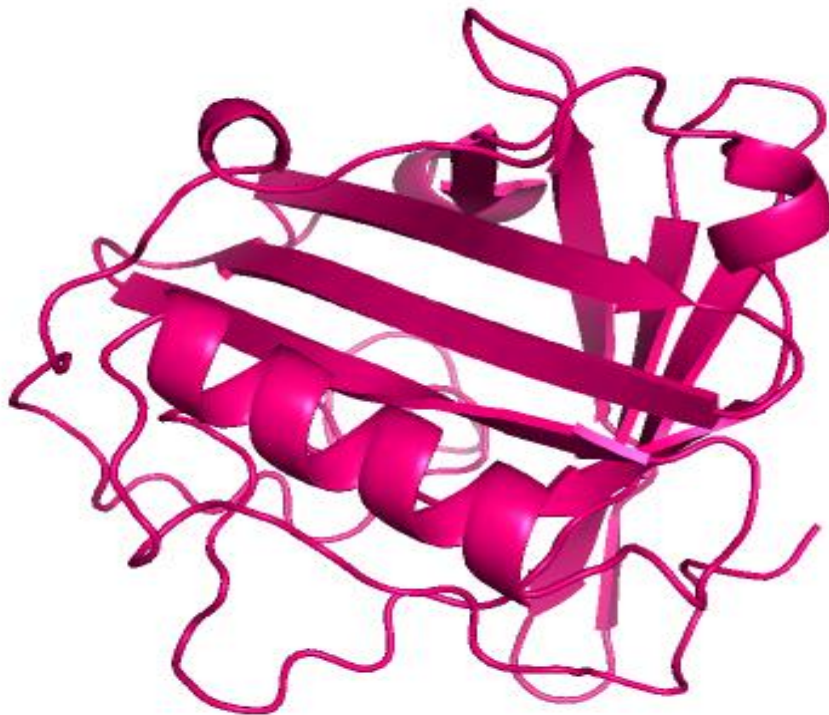


Figura 10. Estrutura predita no software I-Tasser da proteína PA20.

6. Discussão

A metodologia considerada padrão ouro para diagnosticar o câncer de bexiga é um teste caro, invasivo e que tem efeitos colaterais que vão de sangramento, dor até uma infecção de bexiga, que além de tudo é um dos fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (CHAKRABORTY et al., 2019). O estresse que as células do urotélio sofrem devido a essas inflamações crônicas podem ocasionar em danos celulares, que por sua vez pode contribuir para o desenvolvimento do câncer de bexiga. A proliferação celular ocasionada por meio das inflamações crônicas contribui para o desenvolvimento de um ambiente rico em células inflamatórias, fatores de crescimento, angiogênese e o mutações no DNA. As inflamações em sua maior parte são ocasionadas por organismos patogênicos como o parasita *Shistosoma haematobium* que corrobora para o desenvolvimento já que as inflamações ocasionadas contra os ovos deste parasita resultam em agentes genotóxicos que oferecem mutações nas células do urotélio da bexiga (NESI et al., 2015). Porém ainda existem inflamações que estimulam as células do sistema imune a trabalhar, como o tratamento de imunoterapia com bacilo Calmette-Guerin (BCG) que possui mecanismos antiproliferativos. Segundo Botelho, as inflamações ocasionadas pelo parasita *S. haematobium* podem ser um fator oncogênico relacionado a mutações no gene *k-ras* (BOTELHO; MACHADO; DA COSTA, 2010).

Além disso, a cistoscopia também um exame utilizado para o rastreamento da doença, sendo necessário ser realizado de 6 em 6 meses e ter esses efeitos colaterais que colaboram para um ambiente tumoral estável, se torna interessante pesquisas que visam encontrar biomarcadores que apresentem a mesma confiabilidade do teste de cistoscopia. O câncer do tipo invasivo ocorre em pacientes que já tiveram esta neoplasia na forma não invasiva, e possui uma reincidência alta em um período de 5 anos para o tipo invasivo. Visto isso, desenvolver um teste que consiga fazer o rastreamento dessa neoplasia de uma maneira menos invasiva e com menos efeitos colaterais, é interessante, principalmente no monitoramento de pacientes que já tiveram câncer não invasivo*.

Com isso, o objetivo do presente trabalho, visou encontrar por meio de abordagens *in silico* proteínas presentes na urina que apresentem potencial

biomarcador para diagnosticar câncer de bexiga do tipo invasivo. Dentre as proteínas que foram encontradas estão a PA14, PA19 e PA20.

A proteína PA14 é uma proteína da família metaloproteíases de matriz dependentes de zinco, que pode ser encontrada em diferentes fluidos corporais, incluindo a urina, apresenta uma alta versatilidade para ser estudada, podendo ser feitas análises de imuno-histoquímica, western blot, qPCR, dentre outras técnicas. Faz parte da classe das gelatinases e possui um papel importante para o desenvolvimento do câncer de bexiga. A família dessa proteína está envolvida em diferentes processos tumorais como crescimento, proliferação, angiogênese e outros. Já a PA14 desempenha um papel importante na invasão do câncer de bexiga e ainda que existe uma correlação entre com o aumento da atividade lítica da proteína no câncer de bexiga de alto grau e em estágio avançado*. Estudos que avaliaram a concentração dessa proteína na urina e no sangue demonstrou que existe uma concentração significativa dessa proteína em pacientes com câncer de bexiga, em ambos os fluidos, foi relatado uma especificidade e sensibilidade de 90% e 67,3%, respectivamente na urina*.

A proteína PA19 faz parte de uma das vias oncogênicas do câncer de bexiga que está associada a mutações ocasionadas nas proteínas mutantes p53, que promovem invasão e motilidade das células cancerígenas por meio desta via. Além disso essa proteína também é encontrada em um outro subgrupo de câncer de bexiga basal o qual é responsável por cerca de 23,5% dos casos que se tornam invasivos. Essa proteína também está associada ao prognóstico da doença, visto que alguns autores demonstram que a sua superexpressão está relacionada a um pior prognóstico*. Os pacientes em um determinado estudo mostraram uma proporção elevada desta proteína de 58,3%, de forma que esta proteína seja um fator independente para mortalidade do câncer de bexiga*. Em outro estudo esta proteína foi detectada em sete de oito linhagens celulares de câncer de bexiga invasivo de alto grau, indicando que PA19 é liberada em meio a ausência de soro PAM. Ainda no presente estudo foi identificado em pessoas saudáveis a concentração desta proteína na urina foi de 153 picograma (pg) por mg de creatinina, e não demonstrou um aumento significativo em pacientes com câncer de bexiga não invasivo. Porém em pacientes com câncer de bexiga invasivo, a concentração desta proteína foi de 224 a 317 pg por mg de creatinina. A PA19 na urina está elevada em 27% dos pacientes com a neoplasia no tipo

invasivo, que por sua vez não se demonstra um marcador diagnóstico promissor, mas sim um ótimo biomarcador para prognóstico da doença independente da sobrevida específica, sendo então promissor para auxiliar na investigação da doença na forma mais agressiva. Essa proteína foi encontrada no plasma de pacientes com outros tipos de câncer, porém não se mostrou significativamente promissor tanto para diagnóstico e prognóstico*.

A proteína PA20 é membro da família lipocalina que é caracterizada pela sua capacidade de ligar pequenas moléculas hidrofóbicas como prostaglandinas, hormônios e ácidos graxos, que geralmente se ligam a receptores específicos de superfície celular e formam macromoléculas complexas. Essa proteína específica apresenta diferentes formas e já encontradas como monômero, homodímero e um heterodímero ligado por pontes dissulfeto. Possui variadas funções, e dentre elas é um fator do sistema imune inato, liberado por neutrófilos em locais de infecção e inflamação, que visa fagocitar bactérias. Também foi relatado que esta proteína está relacionada a entrega de ferro no citoplasma. Outros autores relatam que esta proteína também possui uma correlação com a apoptose. A PA20 ela também é expressa e lesões ocasionadas por renais e o seus níveis séricos podem ser relacionados com a gravidade da lesão. No câncer de bexiga 50,5% dos casos apresentam transcrições nesta proteína que por sua vez, sugere um bom papel com potencial biomarcador para diagnóstico e além disso, estes dados mostram um complexo entre a proteína PA14 e a proteína PA20 que segundo investigações foram encontrados de maneira superexpressa em pacientes com câncer de bexiga do tipo invasivo e também possuem potencial como indicador de prognóstico uma vez que foram detectados em níveis reduzidos em pacientes com a recidiva da doença*.

Neste complexo a proteína PA20 protege a proteína PA14 da degradação, que por sua vez resulta no aumento da atividade da mesma na matriz extracelular, que permite o desenvolvimento do câncer de bexiga. Este complexo é formado por meio de uma ponte de dissulfeto entre a cisteína 107 livre da proteína PA20 e a cisteína da proteína PA19*. Juntas neste complexo essas proteínas conseguem desenvolver inúmeras funções como por exemplo, a degradação da matriz, progressão precoce, angiogênese, disseminação, invasão, motilidade, formação de nichos de células tronco tumorais, regulação e

vigilância imunológica e ainda crescimento metastático. Em relação angiogênese esse complexo regula a proliferação de periquitos, apoptose e recrutamento de células precursoras antigênicas derivadas da medula óssea para o estroma tumoral, fornecendo recursos para o processo de angiogênese e vasculogênico do tumor. Junto disso, promove a hematopoese que por sua vez corrobora para a proliferação a evasão tumoral por meio das células T que são ativadas*.

A proteção que a proteína PA20 fornece a proteína PA19 é proveniente do aumento da concentração da proteína PA20 no local do tumor. Alguns estudos demonstraram que independente do tampão utilizado e do pH, sempre quando a proteína PA14 e a proteína PA20 formam um complexo, a proteína PA20 é capaz de proteger a proteína PA14 da degradação e quanto maior a concentração da proteína PA20 mais a proteína PA14 consegue contribuir com a proliferação das células tumorais*.

7. Conclusão

Por meio deste trabalho e da abordagem *in silico* utilizada, acredita-se que é vantajoso desenvolver estudos sobre essas proteínas para num futuro desenvolver um teste de diagnóstico com a mesma confiabilidade do teste de cistoscopia. Abordagens proteômicas, e outras análises para conhecimento dessas proteínas ainda são necessárias para avaliar o real potencial biomarcador de cada uma delas, além de tudo o estudo de desenvolver uma quimera dessas proteínas e de anticorpos monoclonais, bem como a melhor para criação do teste. Podendo assim ser desenvolvido um teste *lateral flow* ou ainda um teste de diagnóstico por ELISA.

8. Referência

AMORIM, Gelbert. **Aspectos moleculares do câncer de bexiga**. [s. l.], v. 9, n. 31, p. 95–9, 2011.

ARRUDA, Felipe Teles De; VIANI, Gustavo Arruda. **A Análise de 20 anos do modelo de remuneração do SUS para a radioterapia**. *Brazilian Journal of Oncology*. v. 13, n. 44, p. 1, 2017.

AZOULAY, Laurent et al. **The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: Nested case-control study**. *BMJ*. v. 344, n. 7862, 2012.

BOTELHO, Monica Catarina; MACHADO, Jose Carlos; DA COSTA, Jose Manuel Correia. **Schistosoma haematobium and bladder cancer: What lies beneath?** *Virulence*. v. 1, n. 2, p. 84–87, 2010.

BURGER, Maximilian et al. **Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer***European Urology*. Elsevier. 2013.

CALADO, Bruno Nagel et al. **Carcinoma de células pequenas de bexiga Small cell carcinoma of the bladder**. v. 13, n. 1, p. 114–120, 2015.

CALAIS, F.; SILVA, D. A.; OLIVEIRA, Pedro. **Update 2010 Monografias GPGU..** Disponível em: <www.ferrer.pt>. Acesso em: 17 out. 2019.

Câncer de bexiga | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

CERRONE, Margherita et al. **Geo-location of oncological diseases in the extra-urban areas of naples and creation of territorial biobanks: An important tool to study potential connections between environmental factors and cancer**. *Anticancer Research*. v. 38, n. 11, p. 6459–6463, 2018.

CHAKRABORTY, Ashish et al. **Urine protein biomarkers for the detection, surveillance, and treatment response prediction of bladder cancer**. *American journal of cancer research*. v. 9, n. 6, p. 1104–1117, 2019.

CHEN, Mei Ju May et al. **TCPA v3.0: An Integrative Platform to Explore the Pan-Cancer Analysis of Functional Proteomic Data**. *Molecular & cellular proteomics*. v. 18, n. 8, p. S15–S25, 2019.

CHOI, Ji-Hye; HONG, Seong-Eui; WOO, Hyun Goo. **Pan-cancer analysis of systematic batch effects on somatic sequence variations**. *BMC Bioinformatics*. v. 18, n. 1, p. 211, 2017.

CHOI, Woonyoung et al. **Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset***European Urology*. Elsevier, 2017.

Citoscopia para Diagnóstico de Câncer de Bexiga - Instituto Oncoguia. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/citoscopia-para-diagnostico-de-cancer-de-bexiga/7567/202/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

COHEN, David Jacques. **Câncer Invasivo de Bexiga.** 2010.

COMMEAN, Paul K. et al. **A Query Tool for Investigator Access to the Data and Images of the National Lung Screening Trial.** Journal of Digital Imaging. v. 28, n. 4, p. 439–447, 2015.

D’COSTA, Jamie J. et al. **A Systematic Review of the Diagnostic and Prognostic Value of Urinary Protein Biomarkers in Urothelial Bladder Cancer.** Bladder cancer. v. 2, n. 3, p. 301–317, 2016.

DEGEORGE, Katharine C.; HOLT, Harry R.; HODGES, Stephanie C. **Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment.** American family physician. v. 96, n. 8, p. 507–514, 2017.

DENG, Mario et al. **Web-TCGA: An online platform for integrated analysis of molecular cancer data sets.** BMC Bioinformatics. v. 17, n. 1, 2016.

DENG, Mario et al. **FirebrowserR: An R client to the Broad Institute’s Firehose Pipeline.** Database. v. 2017, n. 1, 2017.

Exames de Laboratório para Câncer de Bexiga - Instituto Oncoguia. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/exames-de-laboratorio-para-cancer-de-bexiga/1906/202/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

FAN, Yu et al. **MuSE: accounting for tumor heterogeneity using a sample-specific error model improves sensitivity and specificity in mutation calling from sequencing data.** Genome Biology. v. 17, n. 1, p. 178, 2016.

FARLING, Kristen Burns. **Bladder cancer: Risk factors, diagnosis, and management.** The Nurse practitioner. v. 42, n. 3, p. 26–33, 2017.

FILHO, Eládio Pessoa de Andrade; PEREIRA, Francisco Carlos Ferreira. **Anatomia geral** “. 1º ed. 2009.

FINN, Robert D. et al. **Pfam: the protein families database.** Nucleic acids research. v. 42, n. Database issue, p. D222-30, 2014.

FINN, Robert D. et al. **The Pfam protein families database: towards a more sustainable future.** Nucleic acids research. v. 44, n. D1, p. D279-85, 2016.

FU, Yao et al. **FunSeq2: a framework for prioritizing noncoding regulatory variants in cancer.** Genome Biology. v. 15, n. 10, p. 480, 2014.

GIANNOPOULOU, Aikaterini F. et al. **Revisiting histone deacetylases in human tumorigenesis: The paradigm of urothelial bladder cancer.** International Journal of Molecular Sciences. v. 20, n. 6, 2019.

GLINA, Sidney et al. **Câncer de bexiga - Estadiamento e tratamento I**. Revista da Associação Médica Brasileira. v. 54, n. 3, p. 196–198, 2008.

GOLDMAN, Mary et al. **The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation**. bioRxiv p. 326-470, 2019.

GUI, Yaoting et al. **Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder**. Nature Genetics. v. 43, n. 9, p. 875–878, 2011.

HE, Houguang et al. **ImmunoCyt test compared to cytology in the diagnosis of bladder cancer: A meta-analysis**. Oncology letters. v. 12, n. 1, p. 83–88, 2016.

IBORRA, F. et al. **Lugar de la cistectomía parcial por vía abierta en el tratamiento de los tumores uroteliales de la vejiga**. EMC - Urología. v. 41, n. 4, p. 1–7, 2009.

JORGE, Juliano José. **Imunoterapia no tratamento do câncer**. Brazilian Journal Allergy and Immunology. v. 3, n. 2, p. 133–138, 2019.

KANEHISA, Minoru et al. **KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs**. Nucleic acids research. v. 45, n. D1, p. D353–D361, 2017.

KANEHISA, Minoru; SATO, Yoko; MORISHIMA, Kanae. **BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences**. Journal of molecular biology. v. 428, n. 4, p. 726–731, 2016.

KÖNIG, Horst Erich; LIEBICH, Hans-Georg. Sistema Urinário. **Anatomia** p. 409, 2016.

LAVERY, Hugh J. et al. **A prospective comparison of UroVysion FISH and urine cytology in bladder cancer detection**.

LI, J. et al. **SurvNet: a web server for identifying network-based biomarkers that most correlate with patient survival data**. Nucleic Acids Research. v. 40, n. W1, p. W123–W126, 2012.

LI, Jun et al. **TANRIC: An interactive open platform to explore the function of lncRNAs in cancer**. Cancer Research. v. 75, n. 18, p. 3728–3737, 2015.

MATULEWICZ, Richard S.; DELANCEY, John O.; MEEKS, Joshua J. **Cystoscopy**. JAMA. v. 317, n. 11, p. 1187, 2017.

MCCONKEY, David J.; CHOI, Woonyoung. **Molecular Subtypes of Bladder Cancer Current Oncology Reports**. Current Medicine Group. 2018.

MCDOWALL, Jennifer; HUNTER, Sarah. **InterPro protein classification**.

Methods in molecular biology. v. 694, p. 37–47, 2011.

MERMEL, Craig H. et al. **GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers.** Genome Biology. v. 12, n. 4, p. R41, 2011.

MULDER, Nicola J.; APWEILER, Rolf. **The InterPro database and tools for protein domain analysis.** Current protocols in bioinformatics. v. Chapter 2, p. Unit 2.7, 2008.

Neoplasias uroteliais - Pathologika. 2018 Disponível em: <<https://pathologika.com/citologia/citologia-urinaria/neoplasias-uroteliais/>>. Acesso em: 18 out. 2019.

NESI, Gabriella et al. **Chronic inflammation in urothelial bladder cancer** Virchows Archiv. Springer Verlag, , 2015.

NEWHOUSE, Jeffrey H. et al. **ESTADIAMENTO PRÉ-TRATAMENTO DO CARCINOMA** Estudo Radiológicos Ossos. p. 825–832, 2001.

NEWTON, Yulia et al. **TumorMap: Exploring the molecular similarities of cancer samples in an interactive portal.** Cancer Research. v. 77, n. 21, p. e111–e114, 2017.

NG, Patrick Kwok Shing et al. **Systematic Functional Annotation of Somatic Mutations in Cancer.** Cancer Cell. v. 33, n. 3, p. 450- 462.e10, 2018.

O’SULLIVAN, Paul et al. **A multigene urine test for the detection and stratification of bladder cancer in patients presenting with hematuria.** Journal of Urology. v. 188, n. 3, p. 741–747, 2012.

PASHOS, Chris Leo et al. **Bladder cancer: Epidemiology, diagnosis, and management.** Cancer Practice. v. 10, n. 6, p. 311–322, 2002.

POMPEO, Antonio Carlos Lima et al. **Câncer de bexiga - Tratamento do carcinoma invasivo e metastático.** Revista da Associação Médica Brasileira, 2008.

PUNDIR, Sangya; MARTIN, Maria J.; O’DONOVAN, Claire. **UniProt Tools.** Current protocols in bioinformatics. v. 53, p. 1.29.1-1.29.15, 2016.

RATLIFF, T. L. et al. **T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer.** The Journal of urology. v. 150, n. 3, p. 1018–23, 1993.

Refubium - Bioinformatics modeling of proteomics changes in muscle invasive bladder cancer. Disponível em: <<https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/6117>>. Acesso em: 30 out. 2019.

ROBINSON, James T. et al. **Integrative genomics viewer.** Nature

Biotechnology, 2011.

ROUPRÊT, M. et al. **Diretrizes Para Carcinoma Urotelial Do Trato Urinário Superior**. v. 59, n. 4, 2011.

SAMUR, Mehmet Kemal. **RTCGAToolbox: A New Tool for Exporting TCGA firehose data**. PLoS ONE. v. 9, n. 9, 2014.

SANLI, Oner et al. **Bladder Cancer supplemental material**. Nature Publishing Group. v. 3, p. 1–19, 2017.

SANTOS, Júlio et al. **Schistosomose haematobium e carcinoma da bexiga : Análise retrospectiva de 145 doentes internados no Serviço de Urologia do Hospital Américo Boavida em Luanda**. Associação Portuguesa de Urologia. v. 1, n. January 2006, p. 15–20, 2012.

SCHLITTLER, Luis Alberto et al. **Adenocarcinoma micropapilar e sarcomatóide de bexiga**. Revista Brasileira de Oncologia Clínica. v. 8, n. 27, p. 35–38, 2012.

SHOKEIR, A. A. **Squamous cell carcinoma of the bladder: Pathology, diagnosis and treatment**. BJU International, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA E SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA. **Câncer de Bexiga - Parte I. Projeto Diretrizes**. p. 14, 2006.

STENZL, A. et al. **DIRETRIZES PARA O CÂNCER DE BEXIGA MÚSCULO INVASIVO E METASTÁTICO**. 2012.

Tipos de Câncer de Bexiga - Instituto Oncoguia. 2018. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tipos-de-cancer-de-bexiga/1904/201/>>. Acesso em: 19 maio. 2019.

TOMCZAK, Katarzyna; CZERWIŃSKA, Patrycja; WIZNEROWICZ, Maciej. **The Cancer Genome Atlas (TCGA): An immeasurable source of knowledge Wspolczesna Onkologia**. Termedia Publishing House Ltd., , 2015.

Tratamento do cancro da bexiga | CUF. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-da-bexiga/tratamento>>. Acesso em: 19 out. 2019.

VILLICANA, Patrick et al. **Urine-based assays for the detection of bladder cancer**. Biomarkers in medicine. v. 3, n. 3, p. 265, 2009.

VON MERING, Christian et al. **STRING: A database of predicted functional associations between proteins**. Nucleic Acids Research, 2003.

WANG, Zeya et al. **Transcriptome Deconvolution of Heterogeneous Tumor Samples with Immune Infiltration**. iScience. v. 9, p. 451–460, 2018.

XIAO, Jing; QIU, Yiqing. **Bioinformatics analysis of the gene expression profile in Bladder carcinoma.** Genetics and Molecular Biology. v. 36, n. 2, p. 287–291, 2013.

ZHANG, Xiaoying; ZHANG, Yangde. **Bladder Cancer and Genetic Mutations.** Cell Biochemistry and Biophysics. v. 73, n. 1, p. 65–69, 2015.

ZHANG, Yang. **I-TASSER server for protein 3D structure prediction.** BMC Bioinformatics. v. 9, 2008.