Pedro Edson Moreira Guimarães

**Estudo molecular de genes envolvidos com
adesão celular em câncer de bexiga**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Urologia
Orientadora: Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

São Paulo

2007

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
National Institutes of Health

*Dedico esta tese a meus amados pais,
Filomeno e Maria Cleusa,
exemplos de integridade, luta, dedicação e caráter
e irmãos,
Paulo, Eliana e Frederico
companheiros leais e parceiros de todos os momentos,
os melhores presentes que a vida me deu.*

“Quando vim, nessa viagem, ficar uns tempos na fazenda do meu Tio Emilio, não era a primeira vez. Já sabia que das moitas de beira de estrada trafegam para a roupa da gente umas bolas de centenas de carrapatinhos, de dispersão rápida, picadas milmalditas e difícil catação; que a fruta mal madura da cagaitera, comida com sol quente, tonteia como cachaça; que não valia a pena pedir e nem tomar beijos as primas; que uma cilha bem apertada poupa dissabor na caminhada; que parar a sombra da aroeirinha e ficar com o corpo empipocado de coceira vermelha; que, quando um cavalo começa a parecer mais comprido, é que o arreio esta saindo para trás, com o respectivo cavaleiro; e, assim, longe outras coisas. Mas muitas mais outras eu ainda tinha que aprender.”

João Guimaraes Rosa, Minha Gente - Sagarana

Agradecimientos

À Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, por toda atenção dedicada a este trabalho.

Aos meus demais orientadores Dr. Álvaro Sadek Sarkis e Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho pela amizade, carinho, atenção e companheirismo.

Aos professores Miguel Srougi e Sami Arap pelo apoio recebido.

Ao Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto de pesquisa, sem os quais esta tese não seria possível.

Aos membros do LIM55, especialmente ao Pontes pela amizade.

Aos amigos, médicos e funcionários da Divisão de Clínica Urológica, pelos momentos de aprendizado.

À Cidinha, à Iones e à Mônica por todo o carinho recebido.

À Elisa secretária da pós-graduação, sempre disposta a resolver e esclarecer todas as dúvidas.

Aos pacientes da Divisão de Clínica Urológica.

Aos professores da pós-graduação, Dr. Luiz Felipe e Dra. Consuelo Junqueira, pelas discussões sempre gratificantes.

Ao Prof. Gattaz e ao Laboratório de Neurociências, LIM27, pelo apoio com os experimentos iniciais.

Ao Instituto Ludwig especialmente ao André Vetore, à Andréia Quintela, Felícia, Mariana Brait e Valéria Paixão, pela disponibilidade e troca de informações científicas.

Ao Roger Chamas, a Cíntia, a Flavia, Lúcia, a Mara e a todos os demais do LIM24.

Ao Prof. Krieger e a Ayumi do Laboratório de Cardiologia Molecular, LIM13.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, de forma muito carinhosa a Dra. Sheila e a Neila, pela simpatia e pela competência.

Ao Isaac pelo auxílio.

Ao Dr. Rajvir Dahyia e toda sua equipe, especialmente a Deepa Pookot, Ken Kawamoto e Hiroshi na Veterans Affairs Medical Center, pela prazerosa e competente companhia.

Aos membros da banca de qualificação, pela atenção dada a este trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina.

Ao Direx-LIM, minhas alegres e eficientes monitoras.

À Fundação Faculdade de Medicina, especialmente a Beth e a Alessandra, pelo auxílio em minimizar os processos burocráticos, pelo empenho em diminuir barreiras e por toda atenção recebida; e ao Edmilson, por todo auxílio, mais que fundamental, nas reformas e adequações iniciais do Laboratório de Urologia.

À Adriana Sanuto e ao Tiago Veiga Perreira e pelo auxílio com a parte estatística.

À Evelyn Volsy e à Geórgia Porto, pelas palavras de apoio.

Ao Tiago Sobreira e ao Marcio Almeida, pela ajuda na impressão da tese.

Ao Seu Joaquim, Dona Ilze, Tia Norinha, à Lílían e à Dona Maria que me receberam como um verdadeiro filho.

Ao Carrossel: Eduardo, Carlos Henrique, Flavio, Breno, Cassy, Júlio, Elildo e Tércio, amigos inseparáveis para os quais as distâncias geográficas nada representam.

Aos queridos Emmanuel Dias, Paulo Oliveira e Fábio Passeti, amigos leais sempre dispostos a ajudar, meu muito obrigado pelos encontros gastronômicos-científicos.

À Paula Kageyama pela alegria e visão sempre otimista da vida.

À minha imensa família de São Paulo: Lucas, Nádia, Bia, Fernanda, Naiara, Margareth, Beto, Samuel, Seu Samuel, Fumie, Natália, Bárbara, Letícia, Virgínia, Sebastião, Conceição, Gabriel, Álvaro, Rai, Isabela, Rodrigo Vieira, Ulisses Mancini, Andréa, Daniel, Danilo, Ana.

De forma mais que especial ao Alexandre Hamilton, ao Carlos Henrique, à Cíntia Milani, ao Eduardo Almeida, ao Emmanuel Dias, à Kátia Navarrete, à Laélia Pinto, ao Lucas Guerra, ao Lúcio Santos, ao Paulo Cunha, ao Paulo Oliveira e à Shirley Azevedo, amigos por demais queridos.

À Marília, Joelma, Irani, Carol, Rinaldo, Fabrício, Eduardo, Dani, Cláudia, Guilherme, Rogério, Ângela, Cris Costa, Gizi, Fazinho, Ísis, Karina, Tadeu: todos passarinhos!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho,

Ao meu Anjo da Guarda.

Prefácio

O início desta tese de doutorado coincide com a reestruturação do Laboratório de Urologia LIM-55. Antes de setembro de 2003 o Laboratório de Urologia tinha suas atividades voltadas para a prática de técnicas cirúrgicas.

Assumida a chefia pelo Prof. Álvaro Sadek Sarkis e pelo Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho, o Laboratório de Urologia passou a ser adequado para o desenvolvimento de novas linhas de pesquisa visando primariamente o estudo de marcadores moleculares para o câncer urológico. O desenvolver desta tese acompanhou os passos de adequação do Laboratório de Urologia a sua nova realidade.

Atualmente o Laboratório de Urologia encontra-se sob a Chefia da Dra. Kátia Ramos Moreira Leite.

Esta tese de doutorado é parte integrante do projeto de pesquisa "Biomarcadores para detecção de câncer de bexiga" submetido à CAPPesq para avaliação, Protocolo de Pesquisa 786/02, sendo aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa como consta no parecer nº 173/2003 (06/02/03). Este trabalho é financiado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH), projeto de pesquisa R01 TW006215.

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
<i>Summary</i>	
Introdução	1
História natural do câncer de bexiga	4
Prospecção de novos genes envolvidos com câncer de bexiga	9
Objetivos	12
Material e métodos	14
Exame imuno-histoquímico	16
Extração de DNA de sangue	19
Polimorfismo de ninjurin 1	20
Análise estatística	21
Resultados	23
Imuno-histoquímica	24
E-caderina	26
B-catenina	34
Polimorfismo de ninjurin 1	39
Discussão	44
Conclusões	49
Bibliografia	51
Endereços eletrônicos	67
Anexos	69

Lista de abreviaturas

α -catenina - alfa catenina

β -catenina - beta catenina

BSA - soro albumina bovina

CpG - citosina seguida de guanina

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxiribonucleotídeos

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

γ -catenina - gama catenina

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

kDA - kilo Dalton

LOH - perda de heterozigose

pb - pares de bases

PBS – Tampão fosfato

RFLP – polimorfismo de comprimento por fragmento de restrição (do inglês *Restriction fragment length polymorphism*)

RNA - ácido ribonucléico

RTU - ressecções transuretrais

Lista de figuras

Figura 1 - Expressão imuno-histoquímica de E-caderina.....	18
Figura 2 - Expressão imuno-histoquímica de β -catenina	19
Figura 3 - Genotipagem do polimorfismo de ninjurin 1.....	21
Figura 4 - Expressão nuclear de E-caderina e β -catenina	24
Figura 5 – Padrao mosaico de imuno-expressão de E-caderina.	25
Figura 6 - Êmbolos neoplásicos intravasculares com expressão de E-caderina e β -catenina	25
Figura 7 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de progressão, E-caderina.....	30
Figura 8 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de progressão, comparando as marcações negativo e fraco agrupadas, com as marcações moderado e forte.....	31
Figura 9 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de recidiva, E-caderina.....	32
Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de recidiva, comparando as marcações negativo e fraco agrupadas, com as marcações moderado e forte.....	33
Figura 11 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de progressão, β -catenina.....	38
Figura 12 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de recidiva, β -catenina.....	39
Figura 13 - Distribuição dos alelo C de ninjurin 1 por grau histológico.....	41
Figura 14 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de recidiva, genótipos de ninjurin 1.....	42
Figura 15 - Curva de Kaplan-Meier para a sobrevida livre de progressão genótipos de ninjurin 1	43

Lista de tabelas

Tabela 1 - Distribuição de E-caderina por estadiamento clínico.....	27
Tabela 2 - Distribuição de E-caderina por estadiamento clínico agrupando pT1 a pT3.....	27
Tabela 3 - Distribuição de E-caderina por grau histológico.	28
Tabela 4 - Marcação de E-caderina em focal ou difuso de acordo com o estadiamento clínico.....	29
Tabela 5 - Marcação de β -catenina por estadiamento clínico.....	35
Tabela 6 - Marcação de β -catenina por grau histológico.....	35
Tabela 7 - Marcação de β -catenina em focal ou difuso de acordo com o estadiamento clínico.....	36
Tabela 8 - Marcação de β -catenina em focal ou difuso por grau histológico.....	37
Tabela 9 - Distribuição dos genótipos de ninjurin 1 por grau histológico.....	40

Resumo

Introdução: O câncer de bexiga é a quinta neoplasia mais comumente diagnosticada no Ocidente, acometendo cerca de 336.000 novos indivíduos anualmente e levando a morte 132.000 pacientes em todo o mundo. No Brasil, a incidência de tumores vesicais para o ano de 1999 foi de 7.550, representando 2,8% do total de casos novos de câncer diagnosticados em ambos os sexos. Um dos grandes desafios terapêuticos para o câncer de bexiga é a identificação dos pacientes que inicialmente apresentam carcinoma papilífero de baixo grau, mas que irão recorrer ou progredir.

Métodos: Neste estudo retrospectivo 64 pacientes foram avaliados por imuno-histoquímica para a análise da expressão de E-caderina e β -catenina. As marcações foram classificadas como focal ou difusa e categorizadas em negativo, fraco, moderado e forte. Os resultados foram correlacionados com grau histológico, estadiamento clínico, sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de recidiva. O polimorfismo de ninjurin 1 foi genotipado por PCR-RFLP em 66 pacientes e 108 controles. Os genótipos foram correlacionados com grau histológico, estadiamento clínico, sobrevida livre de progressão e sobrevida livre de recidiva.

Resultados: Em nossa casuística padrões mais intensos de imuno-expressão de E-caderina foram estatisticamente associados a estádios clínicos mais avançados para carcinomas uroteliais da bexiga ($p=0,005$), além de menores tempos de recidiva (0,025) e progressão (0,049). O padrão de marcação difuso foi associado de forma estatisticamente significativa a estádios clínicos mais avançados ($p=0,010$). Não foram encontradas associações significativas entre os padrões de imuno-expressão de β -catenina com grau histológico, estágio tumoral, recidiva ou progressão dos carcinomas uroteliais da bexiga.

O alelo C do polimorfismo D110A de ninjurin 1 foi associado de forma estatisticamente significativa, em nossa amostra, com o aumento do grau histológico ($p=0,041$). Pacientes portadores do alelo C de ninjurin 1 apresentaram menores períodos para progressão tumoral quando comparados aos homozigotos AA ($p=0,010$).

Conclusão: Nossos resultados sugerem que a expressão de E-caderina está envolvida nos processos tumorigênese do carcinoma urotelial de bexiga e que o polimorfismo D110A de ninjurin 1 pode participar da modulação desta patologia.

Descritores: Neoplasia da bexiga urinária; Moléculas de adesão celular; Marcadores biológicos de tumor; Polimorfismo genético; Imunoistoquímica.

Summary

Introduction: Bladder cancer is the fifth neoplasm in Western countries, whose occurrence is 336,000 new cases annually, and also being responsible for 132,000 deaths in the worldwide. The incidence of bladder tumors in Brazil were 7,550 cases in 1999, representing 2,8% of overall diagnosed cancer in both gender. One of the main therapeutic challenges is identify which patients that present low grades neoplasms will present recurrence and/or progression.

Methods: Sixty four patients were evaluated for E-cadherin e β -catenin immuno-expression in a retrospective study. The staining patterns were classified as focal or difuse and categorized as negative, weak, moderate or strong. Results were correlated with tumor grade, clinical stage, progression and recurrence free survival. Ninjurin 1 polymorphism was evaluated by PCR-RFLP in 66 patients and 108 controls. Genotypes were correlated with tumor grade, clinical stage, progression and recurrence free survival.

Results: E-cadherin moderate and strong staining patterns were significantly associated with high clinical stages of urothelial carcinoma of bladder ($p=0.005$), and short recurrence ($p=0.025$) and progression ($p=0.049$). Difuse staining pattern were significantly associated with high clinical stages ($p=0.010$). Neither histological grade, clinical stages, recurrence and progression free survival were associated with β -catenin staining patters in our samples of urothelial carcinoma of bladder.

The allele C of D110A ninjurin 1 polymorphism was significantly associated with high grade tumors ($p=0.041$). C carries patients compared with AA homozygous presented short disease progression ($p=0.010$).

Conclusion: Our results suggest that E-cadherin expression is involved in urothelial carcinoma of bladder tumorigenesis and that D110A ninjurin 1 polymorphism may contribute to modulate this pathology.

Descriptors: Urinary bladder neoplasms; Cell adhesion molecules; Tumor markers, Biological; Polymorphism, Genetic; Immunohistochemistry.

Introdução

O câncer de bexiga é a quinta neoplasia mais comumente diagnosticada no Ocidente, logo atrás de câncer de próstata, mama, pulmão e cólon, acometendo cerca de 336.000 novos indivíduos anualmente e levando a morte 132.000 pacientes em todo o mundo (Parkin et al., 2001).

No Brasil, a incidência e a mortalidade por câncer de bexiga são menores do que aquela relatada nos países desenvolvidos, tanto que esta neoplasia não figura entre os dez principais tipos de câncer abordados nas publicações do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2002, 2005). Segundo as estatísticas nacionais, a incidência de tumores vesicais para o ano de 1999 foi de 7.550, representando 2,8% do total de casos novos de câncer diagnosticados em ambos os sexos (Pascalichio et al., 2000).

Classicamente, este tipo de neoplasia é cerca de 2,5 vezes mais freqüente em homens do que em mulheres (Pashos et al., 2002). A média de idade ao diagnóstico é de cerca de 69 anos para homens e de 71 anos para mulheres, sendo rara a ocorrência do câncer de bexiga antes da quarta década de vida (Lynch e Cohen, 1995).

O tabagismo é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de bexiga na população geral, sendo que fumantes apresentam um risco de quatro a sete vezes maior do que indivíduos que nunca fumaram (Burch et al., 1989). Este risco diminui após o abandono do hábito de fumar, porém num ritmo bastante lento. Mesmo 10 anos após ter-se parado de fumar, o ex-tabagista ainda apresenta uma chance duas vezes superior de desenvolver uma neoplasia urotelial quando comparado a um indivíduo que nunca fumou (Burch et al., 1989). O carcinógeno químico específico responsável pelo desenvolvimento do câncer de bexiga associado ao tabagismo ainda não foi identificado, porém o

aminobifenil e seus metabólitos têm sido apontados como alguns dos mais prováveis (Hoffmann et al., 1969). Uma variedade de carcinógenos de exposição industrial também pode ser implicada como, por exemplo, corantes a base de anilina (Morrison e Cole, 1976), benzinhas (Morrison e Cole, 1976), fuligem e gases oriundos da combustão do carvão (Steineck et al., 1990), hidrocarbonos alifáticos clorados e certos aldeídos como a acroleína (Cohen, 1998). Fatores de risco adicionais incluem exposição prolongada a corpos estranhos intravesicais e infecção (Sturgeon et al., 1994), infestações vesicais por *Schistosoma haematobium* (Lucas, 1982), exposição à ciclofosfamida (O'Keane, 1988) e radioterapia pélvica para outros tipos de câncer (Sella et al., 1989). Receptores de transplante renal também parecem ter uma maior incidência de tumores uroteliais (Buzzeo et al., 1997), assim como usuários crônicos de acetoaminofen e fenacetina (Derby e Jick, 1996).

A classificação aqui utilizada segue o consenso definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (Epstein et al., 1998) e referendada pela publicação da OMS de outubro de 2004 (Eble et al., 2004, Sauter et al., 2004).

A identificação das camadas da bexiga é de fundamental importância para a correta classificação das lesões que a acometem, como pode ser visto no quadro de classificação TNM para o câncer de bexiga (AJCC, 2002).

Tumor Primário (T)

TX: Informação sobre tumor primário não disponível

T0: Sem evidência de tumor primário

Ta: Carcinoma papilífero não invasivo

Tis: Carcinoma *in situ*

T1: Tumor invade tecido conectivo subepitelial (lamina própria)

T2: Tumor invade camada muscular

pT2a: Tumor invade camada muscular superficial (metade interna)

pT2b: Tumor invade camada muscular profunda (metade externa)

T3: Tumor invade tecido perivesical

pT3a: Microscopicamente

pT3b: Macroscopicamente (massa extravesical)

T4: Tumor invade órgãos adjacentes: próstata, útero, vagina, parede abdominal

T4a: Tumor invade próstata, útero, vagina

T4b: Tumor invade a parede abdominal

Linfonodos regionais (N)

NX: Informação sobre linfonodos regionais não disponível

N0: Ausência de metástases para linfonodos regionais

N1: Metástases para um único linfonodo, com 2 cm ou menos de diâmetro

N2: Metástases para um único linfonodo, com diâmetro entre 2 cm e 5 cm; ou para linfonodos múltiplos, nenhum destes com mais de 5 cm de diâmetro

N3: Metástases para linfonodos com mais de 5 cm de diâmetro

Metástases à distância (M)

MX: Informação sobre metástases à distância não disponível

M0: Ausência de metástases à distância

História natural do câncer de bexiga

Acreditava-se que a maioria dos carcinomas uroteliais de bexiga evoluía de uma forma inicialmente benigna para formas malignas através de mutações sucessivas em genes cruciais que regulam crescimento, sobrevivência, apoptose e interações célula-célula. Contudo, estudos clínicos e patológicos indicam que o surgimento dos carcinomas uroteliais segue pelo menos dois mecanismos distintos (Koss, 1992). Estes carcinomas são um grupo heterogêneo de doenças composto por duas variantes fenotípicas que diferem drasticamente quanto ao prognóstico e o comportamento biológico.

O primeiro grupo, denominado papilífero de baixo grau, compreende os papilomas uroteliais, neoplasias uroteliais papilíferas de baixo potencial de malignidade e os carcinomas uroteliais papilíferos não invasivos de baixo grau, e é responsável por cerca de 80% dos carcinomas uroteliais. São frequentemente multifocais e recorrentes, com limitado potencial para invadir as camadas musculares. Supõe-se que estes tumores se originem de uma única hiperplasia urotelial nodular e se tratados precocemente por ressecção cirúrgica e imunoterapia intravesical obtém-se taxas de sobrevida de 90% em cinco anos (Wu, 2005).

A segunda forma, a qual corresponde os 20% restantes dos casos de carcinomas uroteliais, se apresentam como tumores invasivos não possuindo os pacientes acometidos história prévia de tumores papilíferos não invasivos de baixo grau. Estes tumores aparentemente surgem por mecanismos *de novo* ou derivam de lesões planas de alto grau, os carcinomas *in situ*. Apesar de tratados com cistectomia radical e por quimioterapias sistêmicas, pelo menos 50% dos pacientes com carcinoma urotelial invasivo morrem por metástases em dois anos após o diagnóstico. O tratamento em pacientes com doença avançada falha em 95% dos casos e a sobrevida para pacientes portadores de metástases é de somente 6% em cinco anos (Wu, 2005).

Um dos grandes desafios terapêuticos para o câncer de bexiga é a identificação dos pacientes que inicialmente apresentam carcinoma papilífero de baixo grau, mas que irão recorrer ou progredir. Atualmente o paciente é submetido a exames regulares com cistoscopia, um método invasivo que gera grande desconforto. Sendo assim, existe a necessidade de métodos não invasivos para diagnóstico, prognóstico e monitoramento de recorrência e progressão do câncer de bexiga.

A perda de heterozigose do cromossomo 16q é uma das mais freqüentes alterações vistas tanto em tumores primários quanto em metástases (Suzuki et al., 1996). Existem vários candidatos a genes supressores tumorais localizados no cromossomo 16q, como por exemplo, o gene da E-caderina, que se encontra localizado no 16q22.1 (Natt et al., 1989). A E-caderina é de particular interesse uma vez que pode atuar como um gene supressor a invasão tumoral (Takeichi, 1991, Karayiannakis et al., 1998, Efstathiou et al., 1999). O gene da E-caderina codifica uma glicoproteína transmembrana cálcio dependente, sendo importante para a adesão intercelular e para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo epitelial (Takeichi, 1991, Gumbiner et al., 2000). A porção citoplasmática da E-caderina está associada a um grupo de proteínas denominadas cateninas (α , β , e γ -catenina). As cateninas, por intermédio da α -catenina se ancoram no citoesqueleto de actina. A proteína E-caderina é altamente expressa na maioria dos tecidos epiteliais normais (Gumbiner et al., 2000), e diminuída ou ausente nos carcinomas humanos como, por exemplo, o câncer de cólon (Pignatelli et al., 1992), estômago (Oka et al., 1992), mama (Droufakou et al., 2001), fígado (Ihara et al., 1996) e bexiga (Byrne et al., 2001). Existe uma significativa correlação entre a perda da expressão da E-caderina e o grau histológico e comportamento biológico das neoplasias (Shariat et al., 2001). Em condições fisiológicas normais, a E-caderina desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário, morfogênese e manutenção da integridade epitelial (Takeichi, 1988). A perda da expressão da E-caderina também se correlaciona com o fenótipo invasivo de células cancerosas *in vitro* (Frixen et al., 1991). Dessa forma, o gene da E-caderina pode ainda desempenhar um importante papel com marcador tumoral (Popov et al., 2000, Nakopoulou et al., 2000). Recentemente

foi sugerido que a imuno-expressão de E-caderina pode ser considerada um fator prognóstico para tumores do trato urinário superior (Kashibuchi et al., 2006).

O mecanismo principal de inativação do gene da E-caderina nos tumores malignos ainda não está totalmente esclarecido. Contudo, mutações (Guilford et al., 1999), perda de heterozigose (Frixen et al., 1991), alterações cromossômicas (Hennig et al., 1995), e hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene E-caderina (Graff et al., 1995, 2000, Ribeiro-Filho et al., 2002) têm todos sido implicados neste processo.

As cateninas, inicialmente identificadas por meio de co-imunoprecipitação com a E- e N-caderinas, são representadas por três membros clássicos chamadas de α -, β -, e γ -cateninas de acordo com a ordem decrescente de suas massas moleculares de 102 kDa, 88kDa, e 80 kDa respectivamente (Peyrieras, et al., 1985, Ozawa e Kemler, 1992). Evidências bioquímicas indicavam que a γ -catenina provavelmente era idêntica à proteína da placa desmossomal conhecida como plakoglobina (Butz e Kemler, 1994). Ainda não está claro se a expressão das cateninas é dependente ou não da expressão das caderinas. Vários estudos demonstraram que os componentes dos complexos clássicos caderina-cateninas obedecem a uma ordem hierárquica de organização. Por exemplo, a E-caderina possui um sítio comum de ligação capaz de acomodar tanto a β -catenina quanto a γ -catenina num padrão mutuamente exclusivo, as quais por sua vez se ligam a α -catenina. Dessa forma, pelo menos dois tipos independentes de complexos caderina-cateninas podem coexistir numa mesma célula, uma contendo β -catenina e o outro contendo γ -catenina. Estes dois tipos de cateninas parecem se associar à E-caderina ainda no retículo endoplasmático logo após a sua síntese. Por outro lado, a α -catenina se torna parte deste

complexo mais tardiamente durante a fase de inserção na membrana citoplasmática. Mediante a ocorrência de contato com outra célula, a α -catenina parece estabelecer uma sólida ancoragem entre o sistema microfilamentar e o complexo caderina-cateninas, levando a redução característica na solubilidade detergente (Kemler, 1993).

Aaltomaa et al. (1999) relataram uma diminuição da expressão de α -catenina relacionada ao câncer de próstata. Estes autores ainda sugerem que a expressão de α e β -catenina pode proporcionar uma informação prognóstica valiosa no câncer de próstata (Aaltomaa et al., 2005). Morita et al. (1999) relataram que a expressão de E-caderina e das α , β , γ -cateninas podem ser marcadores preditivos de câncer prostático. Shiina et al. (2001) mostrou que as β e γ -cateninas podem desempenhar um importante papel na progressão do câncer de bexiga.

Os mecanismos de metástase e/ou invasão de células tumorais envolvem múltiplas e complexas etapas. As β e γ -cateninas desempenham um papel importante neste processo (Stockinger et al., 2001). Estudos têm mostrado que a diminuição da expressão de β e γ -cateninas está relacionada ao processo de metástase tumoral (Mialhe et al., 1997). Relatos recentes sugerem que a β -catenina possui uma função reguladora de vias de transdução de sinal, além do seu clássico papel como regulador do sistema de adesão celular (Behrens, 1999). Associação de expressão alterada de β -catenina tem sido enfatizada no carcinoma colo-retal (Brabletz, 1999) e no câncer de fígado (Miyoshi et al., 1998). No câncer colo-retal o acúmulo intracelular de β -catenina é decorrente tanto de mutações no gene supressor tumoral APC como também no próprio gene da β -catenina (Marin et al., 1997).

A γ -catenina, outra molécula associada à caderina, encontra-se também relacionada ao gene APC (Rubinfeld et al., 1997) e exibe uma atividade sinalizadora similar àquela da

β -catenina em *Xenopus* (Karnovsky e Klymkowsky, 1995). Em tumores humanos, ao contrário da β -catenina, ainda não se sabe se a γ -catenina encontra-se envolvida com vias de transdução de sinal. Embora exista uma grande homologia entre a β e a γ -cateninas (Rubinfeld et al., 1995), o papel funcional como regulador da aderência celular parece um pouco diferente entre estas duas moléculas. Em relação ao câncer de bexiga, o fato de somente a γ -catenina possuir relevância prognóstica, mas não a β -catenina (Syrigos et al., 1998), parece refletir uma diferença potencial no papel funcional ou nos mecanismos de ativação destas duas cateninas. Shiina et al. (2001) demonstraram que as alterações das β e γ -cateninas são um evento tardio favorecendo a progressão de tumores de bexiga induzidos por BBN em camundongos. Alterações afetando o sítio de fosforilação GSK-3b parecem estar associadas à ativação da β -catenina, mas não à ativação da γ -catenina. No câncer vesical humano, a expressão das β - e γ -cateninas é similar à expressão no modelo murino. Em resumo, a inativação da E-caderina, α - β - e a γ -cateninas pode desempenhar um papel importante na iniciação e na progressão do câncer de bexiga.

Prospecção de novos genes envolvidos com câncer de bexiga

Outra região sabidamente associada a câncer de bexiga é a 9q22 (Cairns et al., 1993). Tumores com LOH para esta região têm uma maior recorrência (Simoneau et al., 2000) sugerindo a existência de um gene supressor de tumor para câncer de bexiga neste segmento.

Sanchez-Carbayo et al. (2003) avaliando a expressão diferencial de genes em *pools* de tumores de bexiga de estádios iniciais comparados a *pools* de tumores avançados encontraram que o gene *ninjuria 1* estava diferencialmente expresso. Embora este

resultado não tenha sido corroborado em análises posteriores em amostras individuais, estes dados são questionáveis já que o anticorpo utilizado nas análises imuno-histoquímicas aparentemente é pouco específico. Estudos realizados por nossos colaboradores indicam que este anticorpo se liga tanto a ninjurina 1, a ninjurina 2.

O gene ninjurina 1 está alterado em carcinomas hepatocelulares associados com hepatite crônica viral e cirrose (Kim et al., 2001), é induzido por p53 e foi descrito como um potencial alvo primário para esta proteína podendo estar relacionado com os mecanismos reguladores de ciclo celular (Kannan et al., 2001). Adicionalmente Chen et al. (2001) demonstraram que a proteína de ninjurin 1 está super-expressa em leucemia linfoblástica aguda quando comparada a progenitores normais de linfócitos B da medula óssea, sugerindo que ninjurin 1 possa ser utilizado como marcador para doença residual mínima. Este gene codifica uma molécula de adesão e está mapeado em 9q22.3 (Araki e Milbrandt, 1996), um locus situado entre dois marcadores de LOH sabidamente associados à sobrevida livre de recorrência para tumores de bexiga Ta/T1 (Simoneau et al., 2000). Utilizando análises multivariadas e ajustando os fatores que pudessem interferir nos resultados, tais como grau histológico, estadiamento clínico, tamanho e número de tumores, estes autores demonstraram que a recorrência em tumores de bexiga foi independentemente associada com deleções do segmento 9q22.3. Tumores com este tipo de deleção recorrem mais rapidamente do que aqueles sem deleção (razão do padrão de recorrência = 2,53). Aboukassim et al. (2003), em um estudo mais refinado, usando microssatélites adicionais para esta região cromossômica, encontraram uma alta frequência de LOH para os dois marcadores que circundam ninjurin 1 (35% e 33%, marcadores D9S12 e D9S1803). O marcador D9S12 está localizado a aproximadamente 20Kb a 5' do gene.

Durante o Projeto Genoma do Câncer identificamos um novo polimorfismo neste gene, a troca de uma adenina (alelo A) por citosina (alelo C) na região codificadora, o qual reflete na alteração de um Ácido aspártico por uma Alanina na posição 110 da proteína (D110A). Alguns dados preliminares gerados por nosso grupo junto a colaboradores indicam que o alelo C é menos expresso que o alelo A. Estes dados ainda estão sendo preparados para publicação.

Objetivos

1. Avaliar o padrão de expressão imuno-histoquímico de E-caderina e β -catenina no carcinoma urotelial de bexiga

- Correlacionar o padrão de expressão dessas moléculas de adesão com grau histológico, estágio tumoral, recidiva e progressão do carcinoma urotelial da bexiga

2. Avaliar o polimorfismo de ninjurina 1 em pacientes portadores de carcinoma urotelial de bexiga

- Analisar a possível associação desse polimorfismo gênico com grau histológico, estágio tumoral, recidiva e progressão do carcinoma urotelial da bexiga

Material e métodos

Este é um estudo retrospectivo onde foram estudadas amostras de tecido de carcinoma urotelial de bexiga de um grupo de 64 pacientes, sendo 52 homens e 12 mulheres, com idade variando de 34 a 88 anos ($67,5 \pm 12$ anos), para a análise de expressão de E-caderina e β -catenina por imuno-histoquímica. As amostras foram provenientes de ressecções transuretrais de bexiga (RTU) ou de cistectomias radicais realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Hospital Sírio Libanês de São Paulo. Dos 64 pacientes 25 (39,1%) foram estadiados pTa, 22 (34,4%) pT1, 12 (18,7%) pT2 e 5 (7,8%) pT3. Vinte e quatro (37,5%) apresentaram carcinoma urotelial da bexiga de baixo grau e 40 (62,5%) de alto grau. Todo o histórico clínico e anatomo-patológico dos pacientes foi levantado dentro dos registros do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da USP e do Laboratório de Patologia Cirúrgica e Molecular do Hospital Sírio Libanês de São Paulo. Foram anotados o tempo de seguimento, presença e número de recidivas, tempo de recidiva, presença de progressão, tempo de progressão e tempo de sobrevida livre de doença. As lâminas submetidas aos testes imuno-histoquímicos foram reavaliadas por um único patologista, Dra. Kátia Ramos Moreira Leite.

Para os ensaios moleculares para avaliação do polimorfismo de ninjurina 1 foram analisadas amostras de sangue periférico de 66 pacientes com carcinoma urotelial de bexiga, sendo 53 homens e 13 mulheres, com idade variando de 35 a 89 anos ($65,6 \pm 10,9$ anos) e de 108 controles, todos homens, com idade variando de 43 a 81 anos ($60,4 \pm 8,5$ anos). Os tumores dos pacientes analisados neste estudo tiveram a sua classificação histológica de acordo com as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1973. Dos 66 pacientes, 8 (12,1%) apresentaram pTis, 35 (53%) apresentaram pTa, 14 (21,2%)

apresentaram pT1, 5 (7,5%) apresentaram pT2 e 4 (6%) apresentaram pT3. Vinte e nove (43,9%) pacientes apresentaram carcinoma urotelial da bexiga grau 1, 9 (13,6%) apresentaram carcinoma urotelial de bexiga grau 2 e 28 (42,4%) grau 3. Todos os pacientes deste grupo foram submetidos a RTU de bexiga ou a cistectomia radical no Hospital das Clínicas da USP.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo de Pesquisa 786/02, sendo aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa como consta no parecer nº 173/2003 (06/02/03).

Exame Imuno-histoquímico

Com o intuito de avaliarmos a presença e a localização celular das proteínas dos genes estudados, procedemos com a avaliação imuno-histoquímica de espécimes cirúrgicos de 64 pacientes.

Utilizando a técnica descrita por Taylor et al., (1994) como ponto de partida, o protocolo seguido constituiu-se de cortes representativos de tumores de bexiga em lâminas previamente tratadas com silane, e incubadas por 30 minutos em estufa a 90°C. O material foi desparafinado em xilol por 30 minutos a temperatura ambiente, hidratado em banhos decrescente de etanol (etanol absoluto, 95%, 80% e 50%) por 5 minutos cada. Após lavagem com água corrente o material foi submetido à recuperação antigênica por calor, utilizando para tanto, tampão citrato 1mM, pH 6.0 em banho de vapor por 30 minutos. O material imerso no tampão citrato foi resfriado a temperatura ambiente por 20 minutos e lavado em água corrente. Seguiu-se bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% (10

vol.) em dois banhos de 10 minutos cada. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e em seguida com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos em albumina de soro bovino e PBS e incubados 12 horas a 4°C.

1- Anticorpo policlonal de cabra anti-E caderina

Diluição 1:50

Santa Cruz código sc-1500

2- Anticorpo policlonal de cabra anti- β catenina

Diluição 1:50

Santa Cruz código sc-1496

As lâminas foram lavadas com Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos e em seguida, utilizando o kit Labelled Streptavidin Biotin (LSAB+ System-HRP DakoCytomation código K0690) foi realizada a marcação com o anticorpo secundário e a revelação com streptavidina-peroxidase, seguindo os seguintes passos:

Foram adicionados 100uL do anticorpo secundário (Biotinylated Link Universal) e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente seguida de lavagem com Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos. Foram adicionados 100uL do reagente Streptavidin-HRP, o qual é composto de streptavidina conjugada com peroxidase de *Armoracia rusticana* em PBS, e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente seguida de lavagem com Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos. As lâminas foram então incubadas com 600 uL de solução substrato-cromógeno constituída de 1mg/mL de diaminobenzidina em PBS e 0,02% de peróxido de hidrogênio, pH 7.4, por 10 minutos.

Após lavagem com Tris-HCl 0,05M, pH 7.6 por 5 minutos e em seguida com água corrente, foi realizada contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, seguido de banho de hidróxido de amônia 0,2% e nova lavagem em água corrente. O material foi desidratado em banhos crescentes de etanol (etanol 50%, 80%, 95% e absoluto) por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio óptico. As marcações foram classificadas como focal (até 25%) ou difusa e categorizadas em negativo, fraco, moderado e forte (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Expressão imuno-histoquímica de E-caderina, negativo (A), fraco (B), moderado (C) e forte (D).

Figura 2. Expressão imuno-histoquímica de β -catenina negativo (A), fraco (B), moderado (C) e forte (D).

Extração de DNA de sangue

Após o passo de separação e lavagem dos linfócitos, descrito a seguir, foi adicionada proteinase K seguindo as mesmas etapas do protocolo de extração de material congelado.

Inicialmente 5mL de sangue periférico, coletado com agente anti-coagulante, foram diluídos em 5mL de PBS. Em um tubo de 50mL foram adicionados 8mL de solução Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, código 17-1440-02), em seguida o sangue diluído foi transferido cuidadosamente. O material foi centrifugado a 400 g, por 30 minutos, a

temperatura ambiente. A camada de linfócitos foi retirada com o auxílio de uma Pipeta Pasteur e transferida para um tudo de 15mL. Aproximadamente três volumes de PBS foram adicionados à solução contendo os linfócitos para seguir com o processo de lavagem dos mesmos. Depois de homogeneizada a solução foi centrifugada a 100 g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet mais uma vez lavado com PBS.

Polimorfismo de ninjurin 1

As condições para amplificação do fragmento genômico contendo a região do SNP de ninjurin 1 foram: 25ng de DNA, 0,2 μ M de cada oligo (Ninj1F 5'-CTCTGGGCGACAAAACATCC-3' e Ninj1R 5'-CCTCGCGCCCCATCTCC-3'), 0,1mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 $\times$ de tampão da enzima e 1,5 mM de $MgCl_2$ em um volume final de 10 μ L. A reação de PCR consistiu de um passo inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos, finalizando com um passo de extensão a 72°C por 7 minutos.

Após a amplificação, 4 μ L do produto da PCR foram digeridos com 4U de *Hae*III e 1 $\times$ de tampão da enzima, a 37°C por 2 horas em banho seco.

Após a digestão o produto foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e corado com prata (Sanguinetti et al., 1994) para visualização dos fragmentos.

Este ensaio PCR-RFLP foi utilizado por distinguir entre os alelos A e C do polimorfismo D110A de ninjurin 1. O fragmento de 342pb resultante da PCR, após digestão com *Hae*III, gerou na presença do alelo A quatro fragmentos de 7pb, 41pb, 82pb e 212pb. Já o alelo C criou um novo sítio de restrição dentro do fragmento de 212pb, o qual

foi então digerido em 176pb e 36pb. Desta forma o fragmento de 212pb refletiu a presença do alelo A enquanto o fragmento de 176pb refletiu a presença do alelo C (Figura 3).

Figura 3. Indivíduos homozigotos para o alelo A apresentaram somente o fragmento de 212pb enquanto indivíduos homozigotos para o alelo C apresentaram somente o fragmento de 176pb. Indivíduos heterozigotos apresentaram ambos os fragmentos.

Análise estatística

Para análise de associação entre o estágio tumoral, grau histológico e a expressão de E-caderina e β -catenina e os genótipos de ninjurin, foi usado o teste Qui-Quadrado, e nos casos em que este não foi adequado foi utilizado o Teste Razão de Verossimilhança. Para análise de tempo de recidiva e progressão em relação à expressão das duas moléculas de adesão e em relação ao genótipos de ninjurin 1 foi utilizado o Método de Kaplan-Meier, e a comparação entre as curvas foi realizado utilizando o Teste Log-Rank.

Para as análises de distribuição de idade e sexo dos pacientes em relação à expressão das proteínas foram utilizados, Análise de Variância (ANOVA) e a generalização do Teste Exato de Fisher, respectivamente.

Em todas as análises estatísticas foi adotado um valor de significância de 5%, ou seja, foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

Imuno-histoquímica

Amostras de 64 carcinomas uroteliais de bexiga foram estudadas por imuno-histoquímica para avaliação de expressão de E-caderina e β -catenina.

O padrão de expressão predominante para ambos os anticorpos é de membrana, com eventual coloração citoplasmática associada. Para a avaliação de intensidade levamos em consideração apenas a marcação de membrana, que foi definida subjetivamente como fraca, moderada e forte (Figuras 1 e 2).

Em 4 casos observamos expressão nuclear focal associada à expressão de membrana de E-caderina, o que ocorreu em 2 casos para β -catenina (Figura 4).

Figura 4. Expressão nuclear de E-caderina (A) e β -catenina (B).

A avaliação quanto à distribuição considerou expressão focal quando $\leq 25\%$ da neoplasia exibiu coloração para o marcador. Para E-caderina 15 (24,2%) casos exibiram distribuição focal. Para β -catenina este número foi 7 (11,1%).

Interessante notar que nos tumores invasivos, as porções mais profundamente infiltrativas exibiram mais forte expressão em relação às porções superficiais (Figura 5).

Figura 5. Aumento da intensidade de expressão de E-caderina nas porções mais profundas, infiltrativas do carcinoma urotelial da bexiga.

Ainda mais interessante é a forte expressão de ambas as moléculas de adesão em êmbolos neoplásicos intravasculares (Figura 6).

Figura 6. Êmbolos neoplásicos intravasculares com forte expressão de E-caderina (A) e β -catenina (B).

E-caderina

As marcações foram categorizadas em negativo, fraco, moderado e forte. Para E-caderina 2 amostras (3,1%) não apresentaram marcação (negativo), 12 amostras (18,8%) apresentaram marcação fraca, 19 amostras (29,7%) apresentaram marcação moderada e 31 (48,4%) apresentaram marcação forte.

Considerando o sexo, podemos notar que não há diferença estatisticamente significativa na distribuição dos resultados de expressão de E-caderina. Das 12 pacientes do sexo feminino que compunham esta amostra, 1 (8,3%) não apresentou marcação para E-caderina (negativo), 5 (41,7%) apresentaram marcação moderada e 6 (50%) apresentaram marcação forte. No grupo de pacientes do sexo masculino, estas frequências se mantiveram com 1 (1,9%) amostra não apresentando marcação (negativo), 12 (23,1%) apresentando marcação fraca, 14 (26,9%) apresentando marcação moderada e 25 (48,1%) apresentando marcação forte. Estes dados sugerem uma marcação homogênea de acordo com o sexo.

Dos pacientes com marcação negativa (2) a média de idade foi de 47 anos (variando de 36 a 58 anos, $\pm 15,6$ anos), para os 12 pacientes com marcação fraca a média de idade foi de 66,3 anos, (variando entre 56 e 74 anos, $\pm 5,5$ anos), para os 19 pacientes com marcação moderada a média de idade foi de 68,2 anos (variando de 42 a 87 anos, $\pm 12,6$ anos) e para os 30 pacientes com marcação forte a média de idade foi de 69 anos (variando de 34 a 88 anos, $\pm 12,1$ anos).

A distribuição da marcação segundo o estadiamento clínico está detalhada na tabela 1, não foi encontrada associação entre as categorias de imuno-expressão de E-caderina e estadiamento clínico. Pode-se notar que a distribuição dos pacientes com estágio pT1, pT2 e pT3 não parecem apresentar diferença uma vez que, nesses três estádios, temos que aproximadamente 60% das amostras apresentaram marcação forte para E-caderina. Com o

objetivo de verificar esse fato foi realizada uma partição do teste Qui-Quadrado o qual mostrou que não há diferença estatisticamente significativa da distribuição dos estádios pT1, pT2 e pT3 nas categorias de E-caderina ($p=0,807$). Dessa forma, os estádios pT1, pT2 e pT3 foram agrupados e analisados em conjunto na tabela 2.

Tabela 1: Distribuição de E-caderina por estadiamento clínico.

E-caderina	Estadiamento clínico				Total
	pTa	pT1	pT2	pT3	
Negativo	2 (8,0%)	-	-		2 (3,1%)
Fraco	6 (24,0%)	2 (9,1%)	3 (25,0%)	1 (20,0%)	12 (18,8%)
Moderado	11 (44,0%)	5 (22,7%)	2 (16,7%)	1 (20,0%)	19 (29,7%)
Forte	6 (24,0%)	15 (68,2%)	7 (58,3%)	3 (60,0%)	31 (48,4%)
Total	25 (100,0%)	22 (100,0%)	12 (100,0%)	5 (100,0%)	64 (100,0%)

$p = 0,113$ – Teste da Razão de Verossimilhança

Tabela 2: Distribuição de E-caderina por estadiamento clínico agrupando pT1 a pT3.

E-caderina	Estadiamento clínico		Total
	pTa	pT1 a pT3	
Negativo	2 (8,0%)	-	2 (3,1%)
Fraco	6 (24,0%)	6 (15,4%)	12 (18,8%)
Moderado	11 (44,0%)	8 (20,5%)	19 (29,7%)
Forte	6 (24,0%)	25 (64,1%)	31 (48,4%)
Total	25 (100,0%)	49 (100,0%)	64 (100,0%)

$p = 0,005$ – Teste da Razão de Verossimilhança

Quando agrupados pT1, pT2 e pT3 encontramos associação estatisticamente significativa entre estágio e E-caderina ($p=0,005$). A marcação moderada foi a mais frequente para E-caderina entre pacientes com estágio pTa, enquanto a marcação forte foi a mais frequente entre pacientes com estágio pT1, pT2 e pT3.

A distribuição da marcação segundo grau histológico está detalhada na tabela 3, também não sendo encontrada associação entre a expressão imuno-histoquímica de E-caderina e o grau de diferenciação tumoral. De acordo com a distribuição por grau histopatológico nas categorias de E-caderina pode-se observar que 55% dos 40 pacientes classificados como alto grau apresentaram marcação forte para E-caderina ao passo que dos 24 pacientes com baixo grau, aproximadamente, 38% deles apresentaram este tipo de marcação. Apesar da diferença observada o teste estatístico não se mostrou significativo ($p=0,561$).

Tabela 3: Distribuição de E-caderina por grau histológico.

E-caderina	Grau histológico		Total
	Alto	Baixo	
Negativo	1 (2,5%)	1 (4,2%)	2 (3,1%)
Fraco	6 (15,0%)	6 (25,0%)	12 (18,8%)
Moderado	11 (27,5%)	8 (33,3%)	19 (29,7%)
Forte	22 (55,0%)	9 (37,5%)	31 (48,4%)
Total	40 (100,0%)	24 (100,0%)	64 (100,0%)

$p = 0,561$ – Teste da Razão de Verossimilhança

As marcações também foram categorizadas em focal e difuso. Para E-caderina 15 amostras (24,2%) apresentaram marcação focal e 47 amostras (75,8%) apresentaram marcação difusa.

Ao separarmos os pacientes por sexo podemos observar que não houve diferenças detectáveis sendo que 3 (27,3%) pacientes do sexo feminino apresentaram marcação focal enquanto 12 (23,5%) pacientes do sexo masculino apresentaram este tipo de marcação. Oito (72,7%) pacientes do sexo feminino apresentaram marcação difusa enquanto 39 (76,5%) pacientes do sexo masculino apresentaram este tipo de marcação.

No grupo de pacientes com marcação focal a média de idade foi de 68 anos (variando de 55 a 82 anos, $\pm 7,7$ anos), e para os pacientes com marcação difusa a média de idade foi de 68,3 anos (variando de 34 a 88 anos, $\pm 12,1$ anos).

A distribuição da marcação segundo o estadiamento clínico está detalhada na tabela 4. Considerando os tumores invasivos na parede muscular e gordura perivesical (pT2, pT3) 100% dos tumores exibiram expressão difusa de E-caderina, enquanto um número menor dos tumores não invasivos ou infiltrativos na lâmina própria (pTa, pT1) apresentaram esta característica, 65,2% e 68,2% respectivamente ($p=0,010$).

Tabela 4: Marcação de E-caderina em focal ou difuso de acordo com o estadiamento clínico.

E-caderina	Estadiamento clínico				Total
	pTa	pT1	pT2	pT3	
Focal	8 (34,8%)	7 (31,8%)	-		15 (24,2%)
Difuso	15 (65,2%)	15 (68,2%)	12 (100,0%)	5 (100,0%)	47 (75,8%)
Total	23 (100,0%)	22 (100,0%)	12 (100,0%)	5 (100,0%)	62 (100,0%)

$p = 0,010$ – Teste da Razão de Verossimilhança

A distribuição da marcação em focal e difusa segundo o grau histológico não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,135$), embora a expressão difusa tenha-se mostrado mais freqüente em amostras de alto grau (82,1%) quando comparada às aquelas de baixo grau (65,2%).

Para somente 45 (70%) pacientes dos 64 avaliados, foi possível obter informações sobre seguimento, progressão e recidiva. O tempo mediano de seguimento destes pacientes foi de 23 meses, variando de 2 a 109 meses. A curva de sobrevida livre de progressão foi dividida de acordo com as marcações de E-caderina, negativo, fraco, moderado e forte (Figura 7). Apesar da forte indicação de que marcações fortes ou moderadas apresentam um menor tempo de sobrevida livre de neoplasia, estes dados não foram estatisticamente significativos.

Figura 7: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de progressão, por marcação de E-caderina.

O grupo fraco não se diferencia em termos de tempo livre de progressão nem daqueles com marcação moderada ou forte como da marcação negativa. A comparação entre a marcação fraca versus moderada e forte também não apresente resultado estatisticamente significativo ($p=0,346$).

Entretanto ao compararmos as marcações negativo e fraco agrupadas, com as marcações moderado e forte, também agrupadas, as diferenças observadas foram estatisticamente significativas ($p=0,049$, Figura 8).

Figura 8: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de progressão, comparando as marcações negativo e fraco agrupadas, com as marcações moderado e forte, também agrupadas.

Assim como a curva de sobrevida livre de progressão, a curva de sobrevida livre de recidiva também foi dividida de acordo com as marcações de E-caderina, negativo, fraco, moderado e forte (Figura 9). À semelhança da análise anterior há sugestão de que marcações fortes ou moderadas apresentem um menor tempo de sobrevida livre de recidiva, entretanto estes dados também não são estatisticamente significativos.

O grupo fraco não se diferencia em termos de tempo livre de recidiva nem daqueles com marcação moderada ou forte como da marcação negativa.

Figura 9: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de recidiva por marcação de E-caderina.

A comparação entre a marcação fraca versus moderada e forte também não apresentou resultado estatisticamente significativo. Desta forma foi possível agrupar as marcações negativo e fraco e as marcações moderada e forte.

Uma re-análise destes resultados também apresentou resultados estatisticamente significativos ao compararmos os novos grupos, negativo/fraco versus moderado/forte, ($p=0,025$, Figura 10).

Figura 10: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de recidiva, comparando as marcações negativo e fraco agrupadas, com as marcações moderado e forte, também agrupadas.

β -catenina

Para β -catenina 2 amostras (3,1%) não apresentaram marcação (negativo), 8 amostras (12,5%) apresentaram marcação fraca, 26 amostras (40,6%) apresentaram marcação moderada e 28 (43,8%) apresentaram marcação forte.

Novamente os pacientes foram avaliados separadamente por sexo. Podemos notar que não há diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Das 12 pacientes do sexo feminino, 1 (8,3%) apresentou marcação fraca para β -catenina, 3 (25%) apresentaram marcação moderada e 8 (66,7%) apresentaram marcação forte. No grupo de pacientes do sexo masculino, 2 (3,8%) amostras não apresentaram marcação (negativo), 7 (13,5%) apresentaram marcação fraca, 23 (44,2%) apresentaram marcação moderada e 20 (38,5%) apresentando marcação forte. Assim como para E-caderina, estes dados sugerem uma marcação homogênea de acordo com o sexo.

Dos pacientes com marcação negativa (2) a média de idade foi de 69 anos (variando de 56 a 82 anos, $\pm 18,4$ anos), para os pacientes com marcação fraca a média de idade foi de 70,6 anos (variando de 61 a 82 anos, ± 7 anos), para os pacientes com marcação moderada a média de idade foi de 64,3 anos (variando de 36 a 86 anos, $\pm 12,0$ anos) e para os pacientes com marcação forte a média de idade foi de 69,6 anos (variando de 34 a 88 anos, $\pm 12,2$ anos).

A distribuição da marcação segundo o estadiamento clínico está detalhada na tabela 5, não sendo encontrada associação entre as categorias de imuno-expressão de β -catenina e estadiamento clínico ($p=0,315$).

Tabela 5: Distribuição da marcação de β -catenina por estadiamento clínico.

β -catenina	Estadiamento clínico				Total
	pTa	pT1	pT2	pT3	
Negativo	1 (4,0%)	-	1 (8,3%)	-	2 (3,1%)
Fraco	2 (8,0%)	4 (18,2%)	1 (8,3%)	1 (20,0%)	8 (12,5%)
Moderado	15 (60,0%)	6 (27,3%)	3 (25,0%)	2 (40,0%)	26 (40,6%)
Forte	7 (28,0%)	12 (54,5%)	7 (58,3%)	2 (40,0%)	28 (43,8%)
Total	25 (100,0%)	22 (100,0%)	12 (100,0%)	5 (100,0%)	64 (100,0%)

$p = 0,315$ – Teste da Razão de Verossimilhança

A distribuição da marcação segundo grau histológico está detalhada na tabela 6, também não sendo encontrada associação entre as categorias imuno-histoquímicas para β -catenina e o grau de diferenciação tumoral.

Tabela 6: Distribuição da marcação de β -catenina por grau histológico.

β -catenina	Grau histológico		Total
	Alto	Baixo	
Negativo	1 (2,5%)	1 (4,2%)	2 (3,1%)
Fraco	4 (10,0%)	4 (16,7%)	8 (12,5%)
Moderado	15 (37,5%)	11 (45,8%)	26 (40,6%)
Forte	20 (50,0%)	8 (33,3%)	28 (43,8%)
Total	40 (100,0%)	24 (100,0%)	64 (100,0%)

$p = 0,596$ – Teste da Razão de Verossimilhança

As marcações também foram categorizadas em focal e difusa. Para β -catenina, 7 (11,1%) amostras apresentaram marcação focal e 56 (88,9%) amostras apresentaram marcação difusa.

Ao separarmos os pacientes por sexo podemos observar que não houve diferenças detectáveis sendo que 1 (8,3%) paciente do sexo feminino apresentou marcação focal enquanto 6 (11,8%) pacientes do sexo masculino apresentaram este tipo de marcação. Onze pacientes (91,7%) do sexo feminino apresentaram marcação difusa enquanto 45 (88,2%) pacientes do sexo masculino apresentaram este tipo de marcação.

No grupo de pacientes com marcação focal (7) a média de idade foi de 64,9 anos (variando de 42 a 83 anos, $\pm 13,3$ anos), e para os pacientes com marcação difusa a média de idade foi de 67,6 anos (variando de 34 a 88 anos, $\pm 11,6$ anos).

Em relação à distribuição da marcação como focal ou difusa de β -catenina e sua correlação com o estadiamento clínico, não observamos diferença estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição da marcação como focal ou difusa de β -catenina por estadiamento clínico. Pode-se observar que não houve associação estatisticamente significativa entre a distribuição de β -catenina e o estadiamento clínico ($p=0,648$).

β -catenina	Estadiamento clínico				Total
	pTa	pT1	pT2	pT3	
Focal	3 (12,5%)	2 (9,1%)	2 (16,7%)	-	7 (11,1%)
Difuso	21 (87,5%)	20 (90,9%)	10 (83,3%)	5 (100,0%)	56 (88,9%)
Total	24 (100,0%)	22 (100,0%)	12 (100,0%)	5 (100,0%)	63 (100,0%)

$p = 0,648$ –Teste da Razão de Verossimilhança

Analisando a distribuição da marcação e o grau histológico observamos que 90% das amostras de alto grau apresentaram marcação difusa enquanto 87% das amostras de baixo grau apresentaram este tipo de marcação. Como pode-se observar na tabela 8, independente do grau histológico, a maioria dos pacientes apresentaram marcação difusa de β -catenina e que as diferenças encontradas não foram estatisticamente significantes ($p=0,699$).

Tabela 8: Distribuição da marcação como focal ou difusa de β -catenina por grau histológico.

β -catenina	Grau histológico		Total
	Alto	Baixo	
Focal	4 (10,0%)	3 (13,0%)	7 (11,1%)
Difuso	36 (90,0%)	20 (87,0%)	56 (88,9%)
Total	40 (100,0%)	23 (100,0%)	63 (100,0%)

$p = 0,699$ – Teste da Razão de Verossimilhança

A curva de sobrevida livre de progressão foi dividida de acordo com as marcações de β -catenina negativo, fraco, moderado e forte (Figura 11). Pode-se observar que os 2 pacientes com marcação negativa para β -catenina não apresentaram progressão do tumor. Os pacientes com marcação fraca foram os que apresentaram progressão em tempos menores, sendo que 50% dos pacientes apresentaram progressão do tumor em 14 meses. O tempo mediano de progressão do tumor entre os pacientes com marcação forte para β -catenina foi de 25 meses. Também pode-se observar que, aproximadamente, 62% dos pacientes com marcação moderada apresentaram tempo de progressão igual a 26 meses.

Apesar das diferenças observadas descritivamente estas não foram estatisticamente significativas ($p=0,510$). Sendo assim não houve associação entre as marcações imuno-histoquímicas para β -catenina e o tempo de sobrevida livre de neoplasia.

Figura 11: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de progressão para as categorias de marcação de β -catenina.

Também não houve associação entre as marcações imuno-histoquímicas para β -catenina e o tempo de sobrevida livre de progressão (Figura 12). Nenhum dos dois pacientes com marcação negativa de β -catenina apresentaram recidivas durante o período de seguimento. Os tempos de recidivas entre as marcações fraca, moderada e forte foram bastante similares, sendo o tempo mediano de 23, 22 e 16 meses para estas categorias

respectivamente. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o padrão de marcação de β -catenina e o tempo de recidiva tumoral ($p=0,522$).

Figura 12: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de recidiva para as categorias de marcação de β -catenina.

Polimorfismo de ninjurin 1

Um conjunto de 66 amostras provenientes de RTU e cistectomia radical de pacientes com carcinoma urotelial de bexiga (53 homens e 13 mulheres) foram genotipados para o polimorfismo D110A de ninjurina 1.

O genótipo AA foi encontrado em 43 (65,1%) pacientes e em 63 (58,3%) controles. O genótipo AC foi encontrado em 22 (33,3%) pacientes e em 41 (37,9%) controles e o genótipo CC em 1 (1,5%) paciente e em 4 (3,7%) controles. A distribuição do alelo A foi de 108 (81,8%) em pacientes e de 167 (77,3 %) em controles, e a do alelo C de 24 (18,2%)

em pacientes e de 49 (22,6%) em controles. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa quando comparamos os genótipos ou os alelos entre pacientes e controles. Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando dividimos o grupo de pacientes por sexo.

Quando avaliamos a distribuição dos genótipos e dos alelos de ninjurina 1 dentro do grupo de pacientes, divididos por estadiamento clínico, não foi encontrada nenhuma associação. Entretanto, a frequência do alelo C de ninjurina 1 em nossa amostra, tende a aumentar com o grau de diferenciação da neoplasia (Tabela 9 e Figura 13). O alelo C foi encontrado em 6 (10,3%) de 58 alelos em pacientes grau 1, em 3 (16,7%) de 18 alelos em pacientes grau 2 e em 15 (26,8%) de 56 alelos em pacientes grau 3. O número de indivíduos portadores do alelo C também tende a aumentar com o grau de diferenciação tumoral. Pacientes portadores do alelo C corresponderam a 20,7% (6/29) dos pacientes com carcinoma urotelial da bexiga grau 1, a 33,3% (3/9) dos pacientes com tumores grau 2 e a 50% (14/28) dos pacientes com tumores grau 3.

Tabela 9: Distribuição dos genótipos de ninjurin 1 por grau histológico.

Grau histológico	Genótipos de ninjurin 1			Total
	AA	AC	CC	
I	23 (79,3%)	6 (20,7%)	0 (0%)	29
II	6 (66,0%)	3 (33,0%)	0 (0%)	9
III	14 (50,0%)	13 (46,4%)	1 (3,6%)	28

Figura 13: Distribuição dos alelo C de ninjurin 1 por grau histológico ($p>0,05$).

Para 48 (72,7%) pacientes dos 66 avaliados, foi possível obter informações sobre seguimento, progressão e recidiva. O tempo mediano de seguimento destes pacientes foi de 50,9 meses, variando de 3 a 139 meses.

Quarenta e um pacientes apresentaram recidiva tumoral, sendo a média do tempo de recidiva de 16,9 meses. Para os pacientes homozigotos AA a média do tempo de recidiva foi de 18 meses e para aqueles que apresentaram o alelo C esta média foi de 14,2 meses. A curva de sobrevida livre de recidiva foi dividida de acordo com a presença (CC ou AC) ou não (AA) do alelo C. Entretanto, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a presença do alelo C e o tempo de recidiva ($p=0,092$, Figura 14).

Figura 14: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de recidiva para as categorias de genótipos de ninjurin 1 (Log Rank: $p=0,092$).

Dos pacientes que apresentaram recidiva 30 também apresentaram progressão tumoral. A média do tempo de progressão foi de 21,5 meses. Para os pacientes homozigotos AA a média do tempo de progressão foi de 23 meses e para aqueles que apresentaram o alelo C esta média foi de 19,3 meses. O único indivíduo homozigoto CC possuiu um tempo de progressão de 6 meses. A fim de avaliarmos se estes resultados eram significativos, a curva de sobrevida livre de progressão também foi dividida de acordo com

a presença (CC ou AC) ou não (AA) do alelo C (Figura 15). E para esta análise as diferenças se mostraram estatisticamente significativas ($p=0,010$).

Figura 15: Curva de Kaplan-Meier para seguimento dos pacientes de acordo com a sobrevida livre de recidiva para as categorias de genótipos de ninjurin 1 (Log Rank: $p=0,010$).

Discussão

É postulado que a molécula de E-caderina possa atuar como um supressor de invasão tumoral (Takeichi, 1991, Karayiannakis et al., 1998, Efstathiou et al., 1999), sendo a perda de heterozigose de sua região cromossômica uma das mais frequentes alterações vistas tanto em tumores primários quanto em metástases (Suzuki et al., 1996). A expressão de E-caderina constitui então uma condição associada ao fenótipo normal dos tecidos epiteliais normais (Gumbiner et al., 2000). Mais uma vez ressaltando que existe uma significativa correlação entre a perda da expressão da E-caderina e o grau histológico e comportamento biológico das neoplasias (Shariat et al., 2001).

Ribeiro-Filho e colaboradores (2002) avaliando a imuno-expressão de E-caderina, encontraram que sua expressão encontra-se diminuída ou ausente em amostras de carcinoma urotelial quando comparadas a epitélio normal. Estes mesmos autores encontraram uma íntima associação entre a perda ou diminuição da expressão de E-caderina e estádios mais avançados desta patologia, sendo que, em todos os tumores grau III avaliados não foi possível observar a imuno-expressão de E-caderina.

Estes dados vêm a corroborar a hipótese de que a perda da expressão de E-caderina seja um importante mecanismo no surgimento e evolução do carcinoma urotelial.

Entretanto, os resultados obtidos nesta tese vão na contra mão da literatura vigente.

Em nossas amostras, encontramos uma associação estatisticamente significativa entre intensidades de marcações mais fortes, para E-caderina, e estádios mais avançados do carcinoma urotelial ($p=0,005$, Tabela 2). Ao avaliarmos a sobrevida livre de progressão e a sobrevida livre de recidiva também encontramos associações estatisticamente significativas entre padrões mais fortes de imuno-expressão e piores prognósticos ($p=0,049$, Figura 8 e $p=0,025$, Figura 10).

Embora não confluentes com a literatura nossos dados apresentam-se consistentes.

Para tentar entender os resultados obtidos foram levantadas algumas hipóteses. A primeira seria a de que foi cometido algum erro durante os experimentos realizados, tal como troca de anticorpo. Esta hipótese é facilmente refutada, já que os resultados presentes nesta tese foram gerados em dois laboratórios diferentes (Hospital Sírio Libanês e Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas) e os dois grupos apresentaram resultados similares.

Outra hipótese seria a de que nosso tamanho amostral poderia ser o fator responsável, já que pequenas amostras podem apresentar maiores variações. Embora nossa amostra não seja tão reduzida não podemos descartar esta hipótese.

Outro resultado encontrado e que merece nossa atenção é o padrão mosaico de marcação para E-caderina. Este padrão pode ser descrito como uma marcação mais intensa para esta molécula na periferia do tumor enquanto o centro apresenta uma marcação fraca ou menos intensa (Figura 5).

Em nossas buscas não foi encontrada nenhuma menção a este tipo de marcação para E-caderina. Aqui também algumas hipóteses podem ser levantadas. A primeira é a de que E-caderina participa ativamente dos processos de invasão tumoral, sendo sua expressão um dos mecanismos pelos quais as células neoplásicas infiltram suas adjacências. Enquanto isso alterações genéticas acumuladas pelo centro do tumor acarretariam a perda da expressão desta molécula.

A segunda hipótese é a de que o centro do tumor acumula mais alterações adquirindo assim, maiores vantagens proliferativas, entre elas a perda da expressão de E-caderina. Com isso comprimiria as regiões da borda do tumor as quais apresentam um fenótipo similar ao epitélio normal, expressando E-caderina.

Consideramos as duas hipóteses plausíveis mas com os resultados que possuímos não podemos acatar ou descartar nenhuma delas.

Talvez o achado mais interessante encontrado em nossas amostras tenha sido a presença de êmbolos neoplásicos com imuno-reatividade intensa para E-caderina e β -catenina. Estes achados vêm de encontro à idéia de que o estabelecimento de metástases a distância envolve ativamente a participação de moléculas de adesão (Gontero et al., 2004), as quais seriam indispensáveis tanto para a manutenção do agregado celular na corrente, quanto para a própria fixação da metástase. Estes achados também não foram encontrados em outras publicações de nosso conhecimento.

A Figura 4 nos apresenta outro achado intrigante, a marcação nuclear de E-caderina. Já é sabido que a marcação de β -catenina está relacionada ao processo de tumorigênese, pois desvia sua via de transdução de sinal (Wappenschmidt et al., 2004), entretanto a marcação nuclear de E-caderina nos parece ser desconhecida até o momento. Não sabemos se a molécula que se encontra no núcleo está intacta ou se é somente um fragmento da proteína. Uma alternativa para responder esta pergunta será utilizar diferentes anticorpos que reconheçam porções distintas da molécula. Caso estes apresentem o mesmo tipo de marcação será sugestão da integridade da molécula no núcleo, caso apresentem padrões distintos isto será uma indicativa de que a molécula está clivada e somente parte foi redirecionada da membrana para o núcleo.

Em nossa casuística não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre os padrões de expressão de β -catenina e os parâmetros clínicos avaliados. Acreditamos que nosso tamanho amostral possa ser uma das razões, já que as associações entre a expressão de β -catenina e o carcinoma urotelial tem sido descritas (Moyano et al., 2006, Romanenko et al., 2006).

Apesar do pouco conhecimento existente a respeito de ninjurin 1 esta molécula se mostrou extremamente atraente, em nossa amostra, dentro do universo do carcinoma urotelial.

O alelo C do polimorfismo de ninjurin 1, o qual confere uma alteração na sequência de aminoácidos da proteína codificada, foi estatisticamente associado a graus histológicos mais agressivos e se mostrou também associado a eventos mais rápidos de progressão. Apesar de não termos conhecimento acerca das vias metabólicas as quais esta molécula está envolvida, nossa curiosidade foi incitada. A possibilidade de utilizar um polimorfismo, o qual é facilmente determinado por métodos minimamente invasivos, como marcador de prognóstico, para o carcinoma urotelial, abre novas perspectivas sobre as abordagens a serem utilizadas na clínica, e a possibilidade de identificar pacientes com maiores riscos para o desenvolvimento de patologias mais agressivas.

Caso nossos resultados se confirmem em amostras maiores, este marcador poderá ser facilmente implementado na rotina dos testes hoje já disponíveis tanto no Hospital das Clínicas como em outros centros.

Conclusões

Em nossa casuística padrões mais intensos de imuno-expressão de E-caderina foram estatisticamente associados a estádios clínicos mais avançados para carcinomas uroteliais da bexiga ($p=0,005$), além de menores tempos de recidiva (0,025) e progressão (0,049).

O padrão de marcação difuso foi associado de forma estatisticamente significativa a estádios clínicos mais avançados ($p=0,010$).

Não foram encontradas associações significativas entre os padrões de imuno-expressão de β -catenina com grau histológico, estágio tumoral, recidiva ou progressão dos carcinomas uroteliais da bexiga.

O alelo C do polimorfismo D110A de ninjurin 1 foi associado de forma estatisticamente significativa, em nossa amostra, com o aumento do grau histológico ($p=0,041$).

Pacientes portadores do alelo C de ninjurin 1 apresentaram menores períodos para progressão tumoral quando comparados aos homozigotos AA ($p=0,010$)

Bibliografia

Aaltomaa S, Karja V, Lipponen P, Isotalo T, Kankkunen JP, Talja M, Mokka R. Reduced alpha- and beta-catenin expression predicts shortened survival in local prostate cancer. *Anticancer Res.* 2005 Nov-Dec;25(6C):4707-12.

Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Kosma VM. Alpha-catenin expression has prognostic value in local and locally advanced prostate cancer. *Br J Cancer.* 1999 May;80(3-4):477-82.

Aboukassim TO, LaRue H, Lemieux P, Rousseau F, Fradet Y. Alteration of the PATCHED locus in superficial bladder cancer. *Oncogene.* 2003 May 15;22(19):2967-71.

Althausen AF, Prout GR Jr, Daly JJ. Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. *J Urol.* 1976 Nov;116(5):575-80.

American Joint Committee on Cancer. Urinary bladder. In: *AJCC Cancer Staging Manual.* 6. ed. New York, Springer, 2002. p.335-340.

Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron.* 1996 Aug;17(2):353-61.

Bassi P. BCG (Bacillus of Calmette Guerin) therapy of high-risk superficial bladder cancer. *Surg Oncol.* 2002 Jun;11(1-2):77-83.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):687-92.

Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(1):15-30.

Boon ME, Blomjous CE, Zwartendijk J, Heinhuis RJ, Ooms EC. Carcinoma in situ of the urinary bladder. Clinical presentation, cytologic pattern and stromal changes. *Acta Cytol.* 1986 Jul-Aug;30(4):360-6.

Bostwick DG. Natural history of early bladder cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1992;16I:31-8.

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1033-8.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):177-86.

Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, Miller AB. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer.* 1989 Oct 15;44(4):622-8.

Butz S, Kemler R. Distinct cadherin-catenin complexes in Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *FEBS Lett.* 1994 Nov 28;355(2):195-200.

Buzzeo BD, Heisey DM, Messing EM. Bladder cancer in renal transplant recipients. *Urology.* 1997 Oct;50(4):525-8.

Byrne RR, Shariat SF, Brown R, Kattan MW, Morton RA JR, Wheeler TM, Lerner SP. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *J Urol.* 2001 May;165(5):1473-9.

Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Preliminary mapping of the deleted region of chromosome 9 in bladder cancer. *Cancer Res.* 1993 Mar 15;53(6):1230-2.

Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, Campana D. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2001 Apr 1;97(7):2115-20.

Cheng L, Neumann RM, Scherer BG, Weaver AL, Leibovich BC, Nehra A, Zincke H, Bostwick DG. Tumor size predicts the survival of patients with pathologic stage T2 bladder carcinoma: a critical evaluation of the depth of muscle invasion. *Cancer*. 1999 Jun 15;85(12):2638-47.

Cohen SM. Urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 1998 Jan-Feb;26(1):121-7.

Cowin P, Kapprell HP, Franke WW, Tamkun J, Hynes RO. Plakoglobin: a protein common to different kinds of intercellular adhering junctions. *Cell*. 1986 Sep 26;46(7):1063-73.

Derby LE, Jick H. Acetaminophen and renal and bladder cancer. *Epidemiology*. 1996 Jul;7(4):358-62.

Droufakou S, Deshmane V, Roylance R, Hanby A, Tomlinson I, Hart IR. Multiple ways of silencing E-cadherin gene expression in lobular carcinoma of the breast. *Int J Cancer*. 2001 May 1;92(3):404-8.

Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15;10(6):1887-93.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Lyon, IACR Press, 2004. p.90-123.

Efstathiou JA, Liu D, Wheeler JM, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, Karayiannakis AJ, Mortensen NJ, Kmiot W, Playford RJ, Pignatelli M, Bodmer WF. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2316-21.

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. *Am J Surg Pathol*. 1998 Dec;22(12):1435-48.

Flamm J, Havelec L. Factors affecting survival in primary superficial bladder cancer. *Eur Urol*. 1990;17(2):113-8.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991 Apr;113(1):173-85.

Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2727-32.

Graff JR, Herman JG, Lapidus RG, Chopra H, Xu R, Jarrard DF, Isaacs WB, Pitha PM, Davidson NE, Baylin SB. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res*. 1995 Nov 15;55(22):5195-9.

Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, deVere White RW, Sarosdy MF, Wood DP Jr, Raghavan D, Crawford ED. Neoadjuvant

chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med*. 2003 Aug 28;349(9):859-66.

Guilford PJ, Hopkins JB, Grady WM, Markowitz SD, Willis J, Lynch H, Rajput A, Wiesner GL, Lindor NM, Burgart LJ, Toro TT, Lee D, Limacher JM, Shaw DW, Findlay MP, Reeve AE. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat*. 1999;14(3):249-55.

Gumbiner BM. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*. 2000 Feb 7;148(3):399-404.

Hennig G, Behrens J, Truss M, Frisch S, Reichmann E, Birchmeier W. Progression of carcinoma cells is associated with alterations in chromatin structure and factor binding at the E-cadherin promoter in vivo. *Oncogene*. 1995 Aug 3;11(3):475-84.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3;93(18):9821-6.

Herr HW, Jakse G, Sheinfeld J. The T1 bladder tumor. *Semin Urol*. 1990 Nov;8(4):254-61.

Herr HW. Tumor progression and survival of patients with high grade, noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. *J Urol*. 2000 Jan;163(1):60-1.

Hoffman D, Masuda Y, Wynder EL. Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature*. 1969 Jan 18;221(177):255-6.

Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Schoenberg M, Zahurak M, Goodman SN, Sidransky D. Quantitation of

promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. J Natl Cancer Inst. 2006 Jul 19;98(14):996-1004.

Hudson MA, Herr HW. Carcinoma in situ of the bladder. J Urol. 1995 Mar;153(3 Pt 1):564-72.

Igawa M, Urakami S, Shiina H, Ishibe T, Kadena H, Usui T. Long-term results with M-VAC for advanced urothelial cancer: high relapse rate and low survival in patients with a complete response. Br J Urol. 1995 Sep;76(3):321-4.

Ihara A, Koizumi H, Hashizume R, Uchikoshi T. Expression of epithelial cadherin and alpha- and beta-catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. Hepatology. 1996 Jun;23(6):1441-7.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

Jackson DP, Lewis FA, Taylor GR, Boylston AW, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. J Clin Pathol. 1990 Jun;43(6):499-504.

Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela I, Kaminski N, Getz G, Domany E, Givol D. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. Oncogene. 2001 Apr 26;20(18):2225-34.

Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Chatzigianni E, Papanikolaou S, Alexiou D, Kalahanis N, Rosenberg T, Bastounis E. Aberrant E-cadherin expression associated with

loss of differentiation and advanced stage in human pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 1998 Nov-Dec;18(6A):4177-80.

Karnovsky A, Klymkowsky MW. Anterior axis duplication in *Xenopus* induced by the over-expression of the cadherin-binding protein plakoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4522-6.

Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA, Kume H, Yamaguchi T, Muto S, Horie S, Kitamura T. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Eur Urol.* 2006 May;49(5):839-45.

Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet.* 1993 Sep;9(9):317-21.

Kim JW, Moon AR, Kim JH, Yoon SY, Oh GT, Choe YK, Choe IS. Up-Regulation of ninjurin expression in human hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Mol Cells.* 2001 Apr 30;11(2):151-7.

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.* 2005 Dec;66(6 Suppl 1):4-34

Koss LG. Bladder cancer from a perspective of 40 years. *J Cell Biochem Suppl.* 1992;16I:23-9.

Li LC, Chui RM, Sasaki M, Nakajima K, Perinchery G, Au HC, Nojima D, Carroll P, Dahiya R. A single nucleotide polymorphism in the E-cadherin gene promoter alters transcriptional activities. *Cancer Res.* 2000 Feb 15;60(4):873-6.

Lin J, Dinney CP, Grossman HB, Jhamb M, Zhu Y, Spitz MR, Wu X. E-cadherin promoter polymorphism (C-160A) and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. Clin Genet. 2006 Sep;70(3):240-5.

Lucas SB. Squamous cell carcinoma of the bladder and schistosomiasis. East Afr Med J. 1982 May;59(5):345-51.

Lynch CF, Cohen MB. Urinary system. Cancer. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):316-29.

Marsit CJ, Karagas MR, Danaee H, Liu M, Andrew A, Schned A, Nelson HH, Kelsey KT. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. Carcinogenesis. 2006 Jan;27(1):112-6.

Messing EM, Young TB, Hunt VB, Gilchrist KW, Newton MA, Bram LL, Hisgen WJ, Greenberg EB, Kuglitsch ME, Wegenke JD. Comparison of bladder cancer outcome in men undergoing hematuria home screening versus those with standard clinical presentations. Urology. 1995 Mar;45(3):387-96.

Mialhe A, Louis J, Montlevier S, Peoch M, Pasquier D, Bosson JL, Rambeaud JJ, Seigneurin D. Expression of E-cadherin and alpha-,beta- and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? Invasion Metastasis. 1997;17(3):124-37.

Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. Cancer Res. 1998 Jun 15;58(12):2524-7.

Morita N, Uemura H, Tsumatani K, Cho M, Hirao Y, Okajima E, Konishi N, Hiasa Y. E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression in prostate cancers: correlation with tumour invasion. *Br J Cancer*. 1999 Apr;79(11-12):1879-83.

Morrison AS, Cole P. Epidemiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 1976 Feb;3(1):13-29.

Mostofi FK, Davis CJ Jr, Sesterhenn IA. Progress in pathology of tumors of the urinary tract. *Prog Clin Biol Res*. 1988;277:1-20.

Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumors. International classification of tumors 19. World Health Organization. Geneva, 1973.

Nakopoulou L, Zervas A, Gakiopoulou-Givalou H, Constantinides C, Doumanis G, Davaris P, Dimopoulos C. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, P120ctn in patients with transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4571-8.

Natt E, Magenis RE, Zimmer J, Mansouri A, Scherer G. Regional assignment of the human loci for uvomorulin (UVO) and chymotrypsinogen B (CTRB) with the help of two overlapping deletions on the long arm of chromosome 16. *Cytogenet Cell Genet*. 1989;50(2-3):145-8.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Tahara H, Tamura S, Miyata M, Doki Y, Iihara K, Matsuyoshi N, Hirano S, et al. Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1992;421(2):149-56.

O'Keane JC. Carcinoma of the urinary bladder after treatment with cyclophosphamide. *N Engl J Med*. 1988 Sep 29;319(13):871.

Ozawa M, Kemler R. Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex. *J Cell Biol.* 1992 Feb;116(4):989-96.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001 Oct 15;94(2):153-6.

Pascalichio JC, Bertozzi AP, Baracat FF. Câncer no Brasil: Incidências e mortalidades no país e no estado de São Paulo. 2000 *Rev Soc Bras Câncer* 3:26-33.

Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract.* 2002 Nov-Dec;10(6):311-22.

Peyrieras N, Louvard D, Jacob F. Characterization of antigens recognized by monoclonal and polyclonal antibodies directed against uvomorulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Dec;82(23):8067-71.

Pignatelli M, Liu D, Nasim MM, Stamp GW, Hirano S, Takeichi M. Morphoregulatory activities of E-cadherin and beta-1 integrins in colorectal tumour cells. *Br J Cancer.* 1992 Oct;66(4):629-34.

Pookot D, Li LC, Tabatabai ZL, Tanaka Y, Greene KL, Dahiya R. The E-cadherin - 160 C/A polymorphism and prostate cancer risk in white and black American men. *J Urol.* 2006 Aug;176(2):793-6.

Popov Z, Gil-Diez de Medina S, Lefrere-Belda MA, Hoznek A, Bastuji-Garin S, Abbou CC, Thiery JP, Radvanyi F, Chopin DK. Low E-cadherin expression in bladder cancer at the transcriptional and protein level provides prognostic information. *Br J Cancer.* 2000 Jul;83(2):209-14.

Prout GR Jr, Barton BA, Griffin PP, Friedell GH. Treated history of noninvasive grade 1 transitional cell carcinoma. The National Bladder Cancer Group. J Urol. 1992 Nov;148(5):1413-9.

Quek ML, Stein JP, Clark PE, Daneshmand S, Miranda G, Cai J, Groshen S, Cote RJ, Lieskovsky G, Quinn DI, Skinner DG. Microscopic and gross extravesical extension in pathological staging of bladder cancer. J Urol. 2004 Feb;171(2 Pt 1):640-5.

Reuter VE. Urinary bladder, ureter and renal pelvis. In: Histology for pathologists. Sternberg SS. 2 ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p.835-847.

Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li LC, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M, Yonezawa S, Dahiya R. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. Mol Carcinog. 2002 Aug;34(4):187-98.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. Cancer Res. 1997 Oct 15;57(20):4624-30.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. J Biol Chem. 1995 Mar 10;270(10):5549-55.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B,

Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D; International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):928-33.

Sanchez de la Muela P, Rosell D, Aguera L, De Castro F, Isa W, Robles JE, Zudaire JJ, Berian JM. Multivariate analysis of progression in superficial bladder cancer. *Br J Urol*. 1993 Mar;71(3):284-9.

Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G, Cordon-Cardo C. Gene discovery in bladder cancer progression using DNA microarrays. *Am J Pathol*. 2003 Aug;163(2):505-16.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*. 1994 Nov;17(5):914-21.

Sauter G, Algaba F, Amin MB, Busch C, Cheville J, Gasser T, Grignon D, Hofstaedter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI. Noninvasive urothelial neoplasias: WHO classification of noninvasive papillary urothelial tumors. In World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Eble JN, Epstein JI, Sesterhenn I (eds): Lyon, IARCC Press, 2004 p. 110.

Sella A, Dexeus FH, Chong C, Ro JY, Logothetis CJ. Radiation therapy-associated invasive bladder tumors. *Urology*. 1989 Mar;33(3):185-8.

Shariat SF, Pahlavan S, Baseman AG, Brown RM, Green AE, Wheeler TM, Lerner SP. E-cadherin expression predicts clinical outcome in carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology*. 2001 Jan;57(1):60-5.

Shiina H, Igawa M, Urakami S, Shigeno K, Yoneda T, Terashima M, Deguchi M, Ribeiro-Filho L, Dahiya R. Alterations of beta- and gamma-catenin in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced murine bladder cancer. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7101-9.

Simoneau M, LaRue H, Aboukassim TO, Meyer F, Moore L, Fradet Y. Chromosome 9 deletions and recurrence of superficial bladder cancer: identification of four regions of prognostic interest. *Oncogene.* 2000 Dec 14;19(54):6317-23.

Steineck G, Plato N, Norell SE, Hogstedt C. Urothelial cancer and some industry-related chemicals: an evaluation of the epidemiologic literature. *Am J Ind Med.* 1990;17(3):371-91.

Stockinger A, Eger A, Wolf J, Beug H, Foisner R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *J Cell Biol.* 2001 Sep 17;154(6):1185-96.

Sturgeon SR, Hartge P, Silverman DT, Kantor AF, Linehan WM, Lynch C, Hoover RN. Associations between bladder cancer risk factors and tumor stage and grade at diagnosis. *Epidemiology.* 1994 Mar;5(2):218-25.

Suzuki H, Komiya A, Emi M, Kuramochi H, Shiraishi T, Yatani R, Shimazaki J. Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer.* 1996 Dec;17(4):225-33.

Syrigos KN, Harrington K, Waxman J, Krausz T, Pignatelli M. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol.* 1998 Nov;160(5):1889-93.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science. 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.

Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development. 1988 Apr;102(4):639-55.

Taylor CR, Shi SR, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. Hum Pathol. 1994 Mar;25(3):263-70.

Thrasher JB, Crawford ED. Current management of invasive and metastatic transitional cell carcinoma of the bladder. J Urol. 1993 May;149(5):957-72.

Torti FM, Lum BL, Aston D, MacKenzie N, Faysel M, Shortliffe LD, Freiha F. Superficial bladder cancer: the primacy of grade in the development of invasive disease. J Clin Oncol. 1987 Jan;5(1):125-30.

Tsukino H, Kuroda Y, Nakao H, Imai H, Inatomi H, Kohshi K, Osada Y, Katoh T. E-cadherin gene polymorphism and risk of urothelial cancer. Cancer Lett. 2003 May 30;195(1):53-8.

Tsutsumi M, Tsai YC, Gonzalgo ML, Nichols PW, Jones PA. Early acquisition of homozygous deletions of p16/p19 during squamous cell carcinogenesis and genetic mosaicism in bladder cancer. Oncogene. 1998 Dec 10;17(23):3021-7.

Weinstein RS, Coon JS, Schwartz D, Miller AW 3rd, Pauli BU. Pathology of superficial bladder cancer with emphasis on carcinoma in situ. *Urology*. 1985 Oct;26(4 Suppl):2-10.

Weinstein RS, Miller AW 3rd, Pauli BU. Carcinoma in situ: comments on the pathobiology of a paradox. *Urol Clin North Am*. 1980 Oct;7(3):523-31.

Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep;5(9):713-25.

Younes M, Sussman J, True LD. The usefulness of the level of the muscularis mucosae in the staging of invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Cancer*. 1990 Aug 1;66(3):543-8.

Zhang X, Ma X, Zhu QG, Li LC, Chen Z, Ye ZQ. Association between a C/A single nucleotide polymorphism of the E-cadherin gene promoter and transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2003 Oct;170(4 Pt 1):1379-82.

Zincke H, Utz DC, Farrow GM. Review of Mayo Clinic experience with carcinoma in situ. *Urology*. 1985 Oct;26(4 Suppl):39-46.

Endereços eletrônicos

BLAT

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>

ClustalW Multiple Sequence Alignment

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

dbSNP

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

ISI Web of Knowledge

<http://www.isiwebofknowledge.com>

NCBI e ferramentas

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Portal de Periódicos da CAPES

<http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>

Primer 3

http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi

Repeat Masker

<http://www.repeatmasker.org>

Anexos