ALCIDES MOSCONI NETO

Análise da expressão de moléculas de adesão no carcinoma urotelial do trato urinário superior: implicações prognósticas

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Miguel Srougi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

ALCIDES MOSCONI NETO

Análise da expressão de moléculas de adesão no carcinoma urotelial do trato urinário superior: implicações prognósticas

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Miguel Srougi

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mosconi Neto, Alcides

Análise da expressão de moléculas de adesão no carcinoma urotelial do trato urinário superior : implicações prognósticas / Alcides Mosconi Neto. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.

Orientador: Miguel Srougi.

Descritores: 1.Moléculas de adesão celular 2.Carcinoma urotelial do trato urinário
3.Neoplasias urológicas 4.Prognóstico

USP/FM/DBD-149/11

“Aos meus pais, Carlos e Maria Lúcia pela criação e orientação, à minha esposa Fabíola pelo amor e companheirismo e aos meus filhos Caio e Artur pela alegria”

Agradecimentos

Sou muito grato a **Deus**, pela oportunidade de ter nascido em uma família abençoada com princípios éticos e morais incontestáveis e no decorrer da vida e do meu desenvolvimento sempre fui cercado de pessoas maravilhosas e com espírito humano superior.

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, pela oportunidade de ter convivido e aprendido durante dois anos que valeram muitos conhecimentos profissionais e humanos, pelo seu profissionalismo, dedicação a medicina aos princípios éticos e morais que transbordam em seus pronunciamentos, atitudes e relacionamentos. Ao seu caráter incontestável, exemplo de ser humano, de postura, grande cirurgião, preocupado em passar o aprendizado aos estudantes, tornando-me muito orgulhoso e honrado em ser orientado por este grande e eterno Mestre.

A **Profa. Dra. Kátia R. M. Leite**, pela sua dedicação, desprendimento, sabedoria, conhecimento científico, destreza em ensinar e pesquisar, deixando-me com muito orgulho e prazer em poder conviver e receber suas orientações, acrescentando tanto em minha vida pessoal e profissional.

A **Sabrina** e ao **Pontes**, amigos eternos que ajudaram e colaboraram tanto para que este projeto fosse concluído. Aos dois faltam palavras adequadas para expressar o sentimento profundo e emocionado que sinto. A vocês sou eternamente grato e orgulhoso de conhecê-los e poder falar com voz firme e

forte sou amigo e tenho muita gratidão por vocês, aprendendo e certamente me tornado melhor como pessoa.

Ao **Prof. Dr. Homero Bruschini** pela oportunidade que me proporcionou em poder fazer uma pós graduação reconhecida mundialmente, cercada de pessoas exemplares e dedicadas ao que fazem, a **Elisa** em especial pela ajuda e a todos do LIM 55.

Aos amigos urologistas e funcionários do Hospital das Clínicas da FMUSP, principalmente ao **Prof. Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio, Dr. Alberto Azoubel Antunes e Dr. Adriano João Nesrallah**, pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos urologistas do Hospital Brigadeiro, principalmente aos Drs. **Carlos Alberto Lenzi, Adalberto Andriollo, Joaquim de Almeida Claro**, pela cobertura em algumas ausências para término desta obra.

Aos meus avós: **Alcides, Thais, Joaquim Djalma e Ana Maria** pelo carinho. Meu avô Alcides infelizmente não conheci, mas tenho muito orgulho em ter o mesmo nome.

Aos meus pais **Carlos e Maria Lúcia** pela orientação, criação, exemplo de postura profissional e ética, guiando e orientando no decorrer da vida, tornando possível chegar até aqui; aos meus queridos irmãos **Beto, Luiz e Helena**.

Aos amigos de Poços de Caldas, principalmente ao grupo de Urologia que me receberam de braços abertos para trabalharmos e crescermos juntos, Dr. **Saulo, Celso e Claudio**.

A minha família **Fabíola, Caio, Artur e Bento** pela compreensão da minha ausência, apoio e carinho que sempre recebi.

Amo muito todos vocês.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª Ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Câncer Urotelial do Trato Urinário Superior	19
1.2	Localização e Distribuição dos tumores	20
1.3	Estadiamento	21
1.4	Patologia	23
1.5	Meios de Disseminação	23
1.6	Tratamento	24
1.6.1	Pelve Renal	24
1.6.2	Ureter	27
1.7	Fatores prognósticos em CUTUS	29
1.8	Moléculas de Adesão	33
1.8.1	E-Caderina	35
1.8.2	Cateninas	37
2	OBJETIVOS	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Pacientes	42

3.2	Microarranjo tecidual	43
3.3	Imuno-histoquímica	45
3.4	Análise estatística	46
3.4	Ética	47
4	RESULTADOS	49
4.1	E-caderina	49
4.2	γ -catenina	53
4.3	α –catenina	56
4.4	β –catenina	58
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÃO	70
7	ANEXO	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

Lista de Abreviaturas

MAC: Moléculas de Adesão Celular

MEC: Matriz Extracelular

TMA: Microarranjo Tecidual

IH: Imuno-histoquímica

CU-TUS: Carcinoma urotelial do trato urinário superior

CCT: Carcinoma de células transicionais

M-VAC: Metotrexate, Vinblastina, Adriamicina, Cisplatina

PSA: Antígeno Prostático Específico

AFP: α -fetoproteína

Hcg: Gonadotrofina coriônica

DHL: Desidrogenase láctica

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração das moléculas de adesão. E-caderina é responsável pela ligação célula-célula. O complexo β e α catenina mantém conexão com a proteína do cito-esqueleto α -actina.

Figura 2. Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado 44

Figura 3. (A) Expressão forte e difusa com padrão de membrana de E-Caderina em carcinoma urotelial de alto grau invasivo de trato urinário superior. (B) Expressão de E-Caderina presente apenas nas porções superficiais de carcinoma urotelial de baixo grau 49

Figura 4: Expressão de E-caderina de acordo com recorrência tumoral. Percentual de recidiva maior entre os pacientes com expressão forte para esta proteína ($p=0,014$) 51

Figura 5: Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de E-caderina 52

Figura 6. (A) Expressão moderada de γ -catenina em carcinoma de baixo grau. Nesta imagem é interessante a expressão nuclear da proteína. (B) Ausência de expressão de γ -catenina em carcinoma de alto grau invasivo 53

Figura 7. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de γ -catenina 55

Figura 8. Curva de Kaplan-Meier demonstrando tempo de sobrevida livre de recidiva segundo a expressão de α -catenina 58

Figura 9. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de β –catenina 62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação TNM de 2010 da AJCC dos tumores de pelve renal e ureter	22
Tabela 2. Sobrevida dos pacientes com CUTUS em função do grau histológico e estágio da doença	26
Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos pacientes	42
Tabela 4: Anticorpos empregados no estudo imuno-histoquímico	46
Tabela 5. Expressão de E-caderina de acordo com as variáveis clínico-patológicas de CUTUS	50
Tabela 6. Expressão de γ -catenina de acordo com as variáveis clínico	54
Tabela 7. Expressão de α -catenina de acordo com as variáveis clínico-patológicas de CUTUS e recorrência tumoral	57
Tabela 8. Expressão de β -catenina de acordo com as variáveis clínico-patológicas de CUTUS	60

Resumo

MOSCONI-NETO A. *Análise da expressão de moléculas de adesão no carcinoma urotelial do trato urinário superior: implicações prognósticas*. 2011. 76p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Introdução: As moléculas de adesão celular (MAC) participam da interação entre o epitélio e a matriz extracelular (MEC) que são importantes para o desenvolvimento normal da célula. Alguns estudos têm revelado que alterações na expressão das MAC têm implicações no processo de carcinogênese. Nosso objetivo foi estudar a influencia da expressão da E-caderina e cateninas por imuno-histoquímica (IH) na previsão prognóstica de pacientes com carcinoma urotelial do trato urinário superior submetidos à cirurgia.

Material e métodos: Avaliamos os espécimes de 20 pacientes com carcinoma urotelial da pelve renal e ureter tratados com nefroureterectomia ou ureterectomia com intenção curativa entre junho de 1997 e janeiro de 2007, todas realizadas pelo mesmo cirurgião (MS). A expressão das MAC foi avaliada através de IH pela técnica de microarranjo tecidual ou “tissue microarray” (TMA), e correlacionada com as características anatomopatológicas do tumor e sobrevida dos pacientes

Resultados: Observamos uma relação entre a expressão de E-caderina com a recidiva da doença. Dos tumores com expressão forte de E-caderina, 85,7% sofreram recidiva contra 50,0% daqueles com moderada expressão ($p=0,014$). Também houve diferença na sobrevida livre de doença, sendo que aqueles com expressão forte evidenciaram media de sobrevida livre de doença de 49,1

meses, enquanto aqueles com expressão moderada ou ausente sofreram média de 83,9 meses ($p=0,011$). A ausência de expressão de α -catenina se relacionou com maior frequência de tumores com mais de 3cm ($p=0,003$).

Conclusões: Demonstramos que a imuno-expressão da E-caderina e α -catenina estão relacionadas com recidiva e tamanho tumoral no carcinoma urotelial do trato urinário alto, podendo constituir novos marcadores prognósticos nessa neoplasia.

Descritores: moléculas de adesão celular, carcinoma urotelial do trato urinário superior, neoplasias urológicas, prognóstico.

Summary

MOSCONI-NETO, A. *Analysis of adhesion molecules expression in the Urothelial Carcinoma of the Upper Urinary tract: Prognostic Implications*. 2011.78p.Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Introduction: The cell adhesion molecules (CAM) participating in the interaction between epithelium and extracellular matrix (ECM) that are important for normal development of the cell. Some studies have shown that changes in the expression of CAM have implications in the process of carcinogenesis. We studied the E-cadherin and catenins expression profile by immunohistochemistry in patients with urothelial carcinoma of upper urinary tract underwent surgery.

Materials and Methods: We evaluated specimens from 20 patients with urothelial carcinoma of renal pelvis and ureter treated with nephroureterectomy or ureterectomy between June 1997 and January 2007, all performed by one surgeon (MS). The expression of CAM was evaluated by tissue microarray technique (TMA).

Results: We observed a relation between E-cadherin expression with disease recurrence. Tumors with strong expression of E-cadherin, 85.7% recurrence compared to 50.0% of those with moderate expression and 0.0% with weak expression ($p = 0.014$). There was also a difference in disease-free survival, and those with strong expression recurrence a median time of 49.1 months

while those with moderate expression recurrence a median time of 83.9 months ($p = 0.011$). The absence of α -catenin expression was associated with tumors larger than 3 cm ($p = 0.003$).

Conclusions: We demonstrate that the immuno-expression of E-cadherin and α -catenin are related to recurrence and tumor size in urothelial carcinoma of upper urinary tract, may be new prognostic markers in these disease.

Keywords: cell adhesion molecules, urothelial carcinoma of upper urinary tract, urological neoplasias prognosis.

Introdução

2 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Urotelial do Trato Urinário Superior

O carcinoma urotelial do trato urinário superior (CUTUS) é a neoplasia que pode acometer a via urinária desde os cálices até o ureter distal. São raras, correspondendo a cerca de 5 a 7% dos tumores renais e 5% de todos os tumores uroteliais (Park et al. 2004). Nos EUA em 2006 surgiram 38,890 novos casos de CUTUS (Jemal et al. 2011). Os tumores primários do ureter são mais raros que os da pelve renal, com uma frequência três a quatro vezes menor (Huben et al., 1988). Tumores ureterais são duas vezes mais comuns em brancos do que em negros e a incidência é de 10 casos por 100.000 habitantes/ano. Assim como no câncer de bexiga, mulheres que desenvolverem câncer ureteral têm 25% mais chance de morrer pela doença do que os homens.

O CUTUS incide principalmente em adultos idosos. Embora existam casos diagnosticados já na terceira década de vida, a idade média desses pacientes é de 65 anos, sempre com incidência maior no sexo masculino, na proporção de 3:1.(Srougi et al 1990)

A etiologia é incerta e muitos fatores contribuem para o desenvolvimento de CUTUS, além da idade, sexo e raça, o hábito de fumar é o fator mais frequentemente associado a este tipo de neoplasia. O tabagismo eleva o risco em três a sete vezes de surgir carcinoma urotelial do trato urinário superior. Outros fatores de risco são o uso de analgésicos (Fenacetina), consumo

excessivo de café, infecção urinária crônica associada à litíase, uso de ervas contaminadas com o fungo *Aristolochia fangchi* e tratamento com ciclofosfamida, cujo metabólito acroleína induz tumores agressivos e de alto grau. Fatores ocupacionais como exposição a carvão vegetal, cocaína, asfalto, piche ou trabalhadores de indústrias químicas, petroquímicas e de tinta, apresentam risco relativo de cerca quatro a seis vezes maior de desenvolver CUTUS.(Srougi et al. 1990)

Foi descrita também associação entre o câncer da pelve renal e a nefropatia familiar endêmica do Danúbio ou nefropatia dos Bálcãs, representando nessa região 40% de todos os tumores renais ao contrário do que acontece em outros países onde o CUTUS representa apenas 5 a 7% dos mesmos. Essa forma de nefropatia, que ocorre em áreas endêmicas localizadas ao longo de rios da bacia do Danúbio, antiga Yugoslavia (Bósnia, Herzegovina, Sérvia, Montenegro, Eslovênia e Croácia), Romênia, Bulgária e Grécia, caracteriza-se por inflamação crônica e progressiva do interstício renal que leva a falência renal e está associada ao desenvolvimento de tumores de pelve renal superficiais, multifocais, de crescimento lento e de baixo grau. A etiologia é desconhecida, porém há um número de agentes etiológicos potenciais estudados, como toxinas fúngicas, vírus, sílica e alguns metais pesados.(Srougi et al 1990)

1.2 Localização e Distribuição dos tumores

O envolvimento bilateral, sincrônico ou metacrônico, ocorre em 2 a 5% dos CUTUS, semelhante ao observado no carcinoma urotelial de bexiga, sendo

que o intervalo médio entre o câncer de bexiga e o surgimento do CUTUS é de 70 meses.

Os tumores ureterais são localizados mais comumente na porção distal, cerca de 70% dos casos, 25% no ureter médio e 5% no ureter proximal.

1.3 Estadiamento

O estadiamento adotado é baseado na classificação TNM dos tumores de pelve renal e ureter, seguindo as orientações da AJCC de 2010, (American Joint Committee on Cancer) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação TNM de 2010 da AJCC dos tumores de pelve renal e ureter

Tumor primário (T)
<p>Tx: Tumor primário não pode ser alcançado</p> <p>T0: Sem evidência de tumor</p> <p>Ta: Carcinoma urotelial papilífero não invasivo</p> <p>Tis: Carcinoma in situ</p> <p>T1: Tumor invade o tecido conjuntivo subepitelial</p> <p>T2: Tumor invade a camada muscular</p> <p>T3: (Pelve renal) Tumor invade o tecido adiposo peripélvico ou o parênquima renal. (Ureter) Tumor invade gordura periuretal</p> <p>T4: Tumor invade gordura perirrenal através do parênquima ou invade órgãos adjacentes</p>
Linfonodos regionais (N)
<p>Nx: Linfonodos não foram alcançados</p> <p>N0: Ausência de metástases</p> <p>N1: Metástase em um único linfonodo < 2 cm</p> <p>N2: Metástase em um único linfonodo >2 cm e < 5 cm ou múltiplos linfonodos < 5 cm</p> <p>N3: Metástase em um linfonodo com > 5 cm</p>
Metástases à distância (M)
<p>Mx: Metástases não podem ser alcançadas</p> <p>M0: Ausência de metástases</p> <p>M1: Metástases a distância presentes</p>

1.4 Patologia

A maioria dos tumores do trato urinário superior se origina no urotélio, sendo mais frequente o carcinoma urotelial, que corresponde a 90% desses tumores. Os outros tipos histológicos são representados pelo carcinoma de células escamosas ou epidermóide e pelo adenocarcinoma. O carcinoma de células escamosas representa 0,7% a 7% dos tumores do trato urinário superior e ocorrem aproximadamente seis vezes mais na pelve renal que no ureter. O adenocarcinoma de pelve renal é extremamente raro, representando menos de 1% dos casos, estando usualmente associado a cálculos urinários, obstrução local por longo tempo e inflamação.

1.5 Meios de Disseminação

O carcinoma de células uroteliais do trato urinário superior pode se disseminar por diferentes vias, incluindo invasão direta do parênquima renal ou estruturas vizinhas, pela extensão epitelial e invasão linfática ou vascular. Em comparação ao carcinoma de bexiga, o CUTUS apresenta maior chance de disseminação. Davis et al. (1987) mostraram que a invasão do tecido hilar renal pelo tumor de pelve renal é um importante fator preditivo para o desenvolvimento de metástases (95%), invasão vascular (83%) e invasão linfática (77%).

1.6 Tratamento

1.6.1 Pelve Renal

O tratamento do CUTUS baseia-se, essencialmente, na ressecção cirúrgica da lesão, através da nefroureterectomia radical com remoção da fáscia de Gerota, ureter ipsilateral e *cuff* de bexiga situado em torno do meato ureteral (Reitman et al. 1987). Quando há extensão para veia renal ou veia cava inferior, a cirurgia pode requerer extração do trombo ou da veia cava inferior. Sob o ponto de vista oncológico, a nefroureterectomia radical constitui a forma ideal de tratamento e isso só pode ser feito eficientemente em pacientes com estádios T0, Ta, Tis, T1, T2, T3. A retirada completa do ureter é fundamental para evolução do paciente, já que a preservação desta estrutura acompanha-se de recorrência tumoral local em até metade dos casos (Zincke, Neves, 1984).

Por ser procedimento menos invasivo, a abordagem laparoscópica tem ganhado popularidade, parecendo ter a mesma eficiência da cirurgia aberta, pois respeita os princípios oncológicos (Gill et al., 2000). As indicações de nefroureterectomia laparoscópica são as mesmas da cirurgia aberta, com poucas exceções que incluem recorrências de tumores grandes e multifocais ou com doença em progressão de grau ou estágio após a realização de um tratamento local. (Mills et al., 2001).

A remoção em bloco da gordura perirrenal e da supra-renal é fundamental para o sucesso da cirurgia e foi demonstrado claramente por Johanson et al. (1979). Comparando dois grupos de pacientes tratados com

nefrectomia radical e com nefrectomia simples, a sobrevida de cinco anos foi respectivamente de 84% e 51%. Tal diferença foi mais significativa quando se consideraram apenas os pacientes com estágios 3 e 4, onde a sobrevida de 5 anos foi de 74% e 37% respectivamente. O maior benefício da nefroureterectomia radical quando comparada com cirurgia conservadora foi demonstrada pela sobrevida de cinco anos de 49% e 23% (Hall et al. 1998).

O tratamento cirúrgico também pode ser realizado de forma conservadora, que inclui apenas nefrectomia simples, sem ureterectomia ou ureterectomia parcial, sem nefrectomia.

Fatores associados ao melhor prognóstico da cirurgia conservadora são o estadiamento pTa, ausência de carcinoma *in situ* (CIS), tumores diplóides e ausência de expressão do p53 (Lancini et al. 2000). Em alguns casos a cirurgia conservadora é a abordagem preferencial, como em algumas situações especiais: rim único, insuficiência renal, tumor pequeno e único, risco operatório proibitivo, cirurgia paliativa, tumor papilar superficial de baixo grau e baixo potencial invasivo (Jabbour et al. 2000; Lancini et al. 2000), sendo adotadas diversas técnicas de abordagem, individualizando caso a caso. Dentre as possibilidades operatórias podemos citar a ressecção parcial da pelve, a nefrectomia parcial, o autotransplante renal com pielovesicostomia, a cirurgia percutânea, a ureteropieloscopia e a ablação endoscópica transuretral.

A recorrência global é de 33 a 44%, sendo 29% para o grau I (GI), 57% para o grau II (GII), e 60% para o grau III (GIII) (Minino et al., 1997; Keeley et al., 1997) e a sobrevida em cinco anos é de 100% para GI, 80% para GII e 60% para GIII (Elliot et al. 1996). A recidiva local do tumor é infreqüente em lesões

de baixo grau e quase inevitável nos tumores de alto grau, sendo que neste segundo grupo, grande numero de pacientes tem progressão da doença e mais da metade morre pela doença (Clark et al. 1999). Levando-se em conta os aspectos discutidos anteriormente, parece mais lógico que os carcinomas uroteliais da pelve renal sejam tratados sempre através de nefroureterectomia, reservando os procedimentos conservadores para casos selecionados.

A sobrevida câncer-específica em cinco anos do CUTUS é de 95,1% para os tumores superficiais, 88,9% na doença localizada, 62,6% nos tumores com invasão locoregional e 16,5% na doença disseminada (Munhoz et al., 2000). Os fatores prognósticos mais importantes no CUTUS no momento são grau histológico e estágio patológico (Hall et al. 1998) (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevida dos pacientes com CUTUS em função do grau histológico e estágio da doença

Tumor	Sobrevida em 5 anos (%)
Grau	
I – II	40-87%
III	0 – 33%
Estágio	
A, Cis, T1	60 - 90%
T2	43 -75%
T3	16 -33%
T4	0 – 5%
N+	0 4 %
M+	0

Em relação ao tratamento radioterápico primário ou adjuvante, os dados disponíveis são inconsistentes (Brookland e col, 1985; Cozad et al., 1995). Na ausência de trabalhos prospectivos randomizados, não há consenso da necessidade da radioterapia adjuvante nos pacientes com carcinoma urotelial da pelve renal (Catton et al., 1996; Hall et al., 1998). Devido ao elevado índice de desenvolvimento de metástase à distância e a baixa frequência de recidiva local após terapêutica cirúrgica agressiva, a radioterapia local adjuvante não é recomendada rotineiramente.

O carcinoma urotelial apresenta boa resposta à quimioterapia. Após recorrência local ou aparecimento de metástases, a quimioterapia citotóxica sistêmica está indicada. O esquema M-VAC (Metotrexate, Vinblastina, Adriamicina, Cisplatina), criou a possibilidade de se controlar a progressão da doença em 40% dos pacientes (Sternberg et al., 1988). No entanto, até o momento, ainda não está estabelecida a superioridade da quimioterapia adjuvante pós – cirurgia por CUTUS (Michael et al. 1998).

1.6.2 Ureter

O carcinoma urotelial de ureter é historicamente tratado com nefroureterectomia com ressecção do segmento vesical periureteral ou eventualmente ureterectomia parcial. A vantagem da cirurgia conservadora é a preservação renal. No entanto, o tumor ureteral é com frequência multifocal. Nesses casos, contudo, a possibilidade de se adotar condutas cirúrgicas mais conservadoras é respaldada pelo fato de que cerca de 60% ocorrem no terço

inferior do ureter, permitindo a remoção de todo ureter distal, até a bexiga, e preservação da unidade renal correspondente.

Cirurgia conservadora deve ser cogitada preferencialmente em lesões do terço distal e que sejam de baixo grau e estágio. Nesses pacientes, a ressecção de todo segmento distal é seguida de reimplante ureterovesical direto ou de emprego de técnicas auxiliares de reconstrução ureteral, como bexiga psoica, cirurgia de Boari, interposição de alça ileal ou autotransplante renal. Resultados com o emprego de tratamento conservador em neoplasias distais do ureter demonstram índices de cura que oscilam entre 68 e 100%, atestando a eficiência deste tipo de orientação terapêutica nas circunstâncias descritas (Grossman, 1978; Johson et al., 1979; Petkovic et al., 1972; Zincke et al., 1984). Nos tumores ureterais localizados nos terço médio e superior, além de nefroureterectomia, pode-se utilizar cirurgia conservadora, representada por ressecção segmentar do ureter e anastomose ureteroureteral (Zincke et al., 1984). Contudo, essa forma de tratamento apresenta um inconveniente importante, relacionado principalmente com a chance de recorrência distal da neoplasia, que em alguns estudos foi observada em 30 a 50% dos pacientes (Mazeman et al., 1976; Zincke et al., 1984). Portanto, nesses casos, as ressecções segmentares só devem ser indicadas em casos de rim único, lesões bilaterais ou nefropatia dos Bálcãs.

Enquanto os resultados com uso de radioterapia em tumores de pelve renal são inconsistentes, respostas objetivas completas foram descritas em pacientes com tumores ureterais residuais tratados com radioterapia local (Babaian et al., 1985). A incidência de recidivas locais reduziu-se de 54% para

16% e a sobrevida média foi um pouco superior no grupo irradiado, o que sugere que radioterapia externa talvez tenha valor no tratamento das neoplasias ureterais de alto grau e estágio.

Em pacientes com doença metastática ou recorrência local pós-cirúrgica, deve-se empregar quimioterapia sistêmica. Os índices de resposta objetiva situam-se entre 60 e 70% e em mais da metade desses casos a resposta é completa, confirmando a atividade da associação de drogas em tumores transicionais do trato urinário superior (Scher et al., 1988; Sternberg et al., 1988). É importante que esses pacientes recebam pelo menos cinco ou seis ciclos de quimioterapia e na persistência de massas residuais pós-quimioterapia, essas lesões devem ser tratadas complementarmente com cirurgia ou radioterapia e cirurgia. As considerações para o tratamento sistêmico do carcinoma urotelial de pelve renal são idênticas ao ureter, uma vez que a biologia tumoral dos CUTUS como também da bexiga, são iguais, com etiologia, patologia e forma de apresentação comparáveis.

1.7 Fatores prognósticos em CUTUS

Os fatores prognósticos clínicos clássicos do CUTUS são: características clínicas, idade, sexo e apresentação clínica. Entre as características patológicas estão o estadiamento, grau histológico, localização (pelve ou ureter) presença de CIS associado, invasão microvascular e diferenciação escamosa. (Murta e cols 2008)

Ademais, uma das características tumorais mais importantes é o volume tumoral. Nas neoplasias sólidas de uma maneira geral, quanto maior for o tumor, maior é a chance do mesmo invadir estruturas vizinhas e metastatizar. Outros fatores prognósticos importantes que têm sido estudados mais recentemente e incluem a densidade microvascular do tumor e o grau de angiogênese. Em vários tumores urológicos, a densidade vascular aumentada se correlacionou positivamente com um pior prognóstico e com uma evolução clínica desfavorável. Sabe-se que a produção de fatores angiogênicos é fundamental para a progressão do tumor em nível local, bem como para sua metastatização. Dessa forma, tem-se procurado refinar as análises de peculiaridades histológicas no sentido de fornecer mais dados relevantes de prognósticos (Folkmann et al., 2002).

As tecnologias de pesquisas em biologia molecular trouxeram grandes avanços na compreensão da gênese e progressão de várias das neoplasias urológicas e possibilitaram o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas baseadas neste conhecimento. A uro-oncologia é, neste sentido, uma especialidade privilegiada. Há vários marcadores tumorais úteis para o diagnóstico, prognóstico e monitorização da resposta terapêutica com aplicabilidade clínica na especialidade, como o antígeno prostático específico (PSA), que talvez seja o marcador tumoral que mais se aproxima daquilo que seria um marcador ideal comparativamente a todos os marcadores hoje disponíveis em oncologia. Isso se deve a suas características, alta sensibilidade, alta especificidade, facilidade técnica de sua dosagem, baixo

custo e aplicação no diagnóstico, estadiamento e monitorização do tratamento (National Cancer Institute. Cancer Facts, 1998).

Além da utilidade do PSA para o diagnóstico e tratamento do câncer da próstata, a uro-oncologia ainda conta com marcadores tumorais utilíssimos para o diagnóstico e seguimento das neoplasias testiculares, dentre os quais se destacam a α -fetoproteína (AFP), a gonadotrofina coriônica (hCG) e a desidrogenase láctica (DHL), alterados na maioria dos pacientes com tumores de testículo não-seminomatoso. É interessante notar que na classificação internacional do American Joint Committee for Cancer (AJCC) de 2002, pela primeira vez foram incorporados dados relativos aos marcadores tumorais junto à classificação TNM dos tumores testiculares, criando-se o fator “S” (serum markers), dados estes que permitem atribuir um maior ou menor risco de recidiva da doença e apresentam impacto no estadiamento (Greene FL, 2002).

Dentre as neoplasias de urotélio também houve avanços, como a introdução em clínica de vários marcadores diagnósticos, como o BTA, a telomerase e o NMP 22, os quais, apesar de ainda não serem capazes de substituir com vantagem a citologia urinária e a cistoscopia ou ureterosopia para fins de diagnósticos ou seguimento, têm aumentado a acurácia diagnóstica desses tumores (Smith et al. 1999; Trindade et al. 1999).

A presença de vários antígenos tumorais, de oncogenes ou de mutações de genes supressores tumorais, tem sido investigada nas neoplasias urológicas, com a finalidade de aperfeiçoar o detalhamento prognóstico e mesmo influenciar nas decisões da terapia primária ou adjuvante (Kybel et al. 2002). Dentre os marcadores teciduais mais estudados, encontram-se as

mutações do gene supressor tumoral p53. Estudos de Sarkis et al. (1995), foram capazes de demonstrar em pacientes com câncer urotelial de bexiga, que a detecção do p53 mutado pode ser um fator importante de predição da progressão de tumores pT1 e também de resposta ao tratamento quimioterápico adjuvante pós-cistectomia. O uso clínico do p53 em neoplasias de urotélio, porém, ainda não foi aceito universalmente devido à existência de trabalhos que não corroboraram esses achados, o que provavelmente se deve as dificuldades intrínsecas ao método de análise do p53 pela imuno-histoquímica.

Entretanto, talvez mais importante que todos os marcadores e fatores prognósticos reconhecidos até hoje, seja a perspectiva que se abre em torno da análise genética dos tumores. Sabe-se que a simples análise dos fatores prognósticos convencionais pode não ser representativa da real evolução tumoral num dado paciente. A tecnologia atual nos tem permitido estudar o genoma de vários tumores, identificando assim genes associados a bom e mau prognóstico.

A tecnologia de microarray permite o estudo da expressão de genes no tecido tumoral, determinando com mais exatidão as chances de progressão da neoplasia. A tecnologia de microarray já é uma realidade prática no câncer de mama (van der Vijver et al., 2002).

Não resta dúvida de que a melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese, viabilidade e progressão tumoral já começa a alterar os padrões de diagnóstico, prognóstico e terapêutico de uma série de neoplasias urológicas (Abbott et al., 2002).

Apesar da evolução dos métodos diagnósticos e, conseqüentemente, do aumento da detecção precoce, ainda resta para o urologista o desafio de buscar novos conhecimentos para esclarecer o comportamento biológico e tentar prever quais pacientes irão apresentar recorrência ou progressão do CUTUS, para que possamos intervir precocemente na evolução da doença.

1.8 Moléculas de Adesão

Interações entre epitélio e a matriz extracelular (MEC) são importantes para o desenvolvimento normal da célula, influenciando o crescimento, sobrevivência e diferenciação da célula epitelial da maioria dos órgãos. As moléculas de adesão celular (MAC) participam dessa interação e são responsáveis pela manutenção do fenótipo epitelial normal.

Alterações da adesão celular podem ter papel importante no processo de oncogênese. Aspectos da carcinogênese, como a invasão e disseminação à distância, envolvem mudanças na adesão entre as células e na interação destas com a MEC, e esta tem sido uma das áreas mais estudadas em oncologia (Albelda et al., 1993).

A oncogênese é caracterizada por vários eventos; primeiro, a neoangiogênese que deve ser induzida pela célula neoplásica no sítio primário para que a nutrição do tumor seja garantida. Segundo, essas células devem degradar e remodelar a membrana basal, então se desconectar do tumor

primário, chegar aos vasos sanguíneos, sobreviver na circulação e por fim aderir a um sítio à distância.

Alterações da adesão e motilidade da célula tumoral são necessárias para que ocorra o conjunto de eventos da carcinogênese, já que perda de adesão, aquisição de receptores com propriedades migratórias e invasivas são mecanismos comuns no desenvolvimento do câncer. Células com maior adesividade têm menor potencial metastático, enquanto que uma menor adesão torna possível a disseminação das células neoplásicas. A maior motilidade e menor adesão são acompanhadas por mudanças na expressão das MAC, especialmente das integrinas e do complexo caderina-cateninas (Stewart et al., 2004).

A figura 1 ilustra as moléculas de adesão que serão estudadas neste trabalho.

Figura 1. Ilustração das moléculas de adesão. E-caderina é responsável pela ligação célula-célula. O complexo β e α catenina mantém conexão com a proteína do cito-esqueleto α -actina.

1.8.1 E-Caderina

E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio com papel importante na adesão intercelular. Sua terminação intracelular é ancorada ao cito-esqueleto pelo complexo α , β , e γ catenina, enquanto sua porção extracelular se conecta com a E-caderina da célula adjacente. A presença da E-caderina é de vital importância para a manutenção da adesão celular e do fenótipo epitelial normal, estando expressa na maioria dos epitélios normais.

O desenvolvimento de metástases requer a perda de adesão intercelular, por isto o estudo da disfunção do complexo E-caderina-catenina tem sido de especial interesse em oncologia (Kemler et al., 1993). A perda de expressão da E-caderina interfere na adesão intercelular e na integridade do epitélio, facilita a invasão do estroma e da microvasculatura pelas células tumorais e possibilita a disseminação do tumor à distância e o estabelecimento de metástases.

A perda completa ou a diminuição da expressão de E-caderina tem sido descrita em vários tumores sólidos como mama, pâncreas, rim, fígado, tireóide, cólon, estômago e ovário, havendo uma relação direta entre a redução de expressão e perda de diferenciação, maior potencial invasivo e metastático, maior estágio clínico e menor sobrevida dos pacientes, o que a qualifica como potencial marcador de prognóstico nesses tumores (Folkman, 2002).

O mecanismo responsável pela diminuição da expressão do gene da E-caderina na carcinogênese ainda não foi completamente esclarecido. Destacam-se a perda de heterozigose, mutação, polimorfismos, deleção ou metilação da região promotora. A hipermetilação das ilhas CpG da região promotora do gene com a conseqüente inibição da sua transcrição vem sendo proposta como um dos principais mecanismos responsáveis pela perda dessa MAC (Li et al., 2001, Woodson et al., 2003, Graff et al., 1995).

No carcinoma urotelial do trato urinário superior a perda da expressão de E-caderina já foi associada como mau fator de prognóstico independente, sendo sua expressão correlacionada com estágio tumoral. Esse fenômeno teve particular interesse para predizer recorrência em pacientes com tumores invasivos de baixo grau (Fromont et al., 2005). Porém em outro estudo, o uso

da E-caderina como marcador prognóstico do CUTUS foi considerado limitado (Nakanishi et al., 1997). Em resumo novos estudos devem ser feitos para esclarecer o papel da E-caderina no CUTUS.

1.8.2 Cateninas

As cateninas α , β e γ são um grupo de proteínas intracelulares que intermediam o contato entre o cito-esqueleto e as caderinas na membrana celular. No epitélio normal a E-caderina liga-se às cateninas β e γ , enquanto que a α -catenina é o elo entre a E-caderina e a actina do cito-esqueleto.

A β -Catenina localiza-se normalmente junto à membrana citoplasmática e atua na adesão celular formando complexo com a E-caderina, porém ao se translocar para o núcleo age também como transdutor de sinal promovendo a transcrição de genes associados à proliferação celular, possuindo um papel mais complexo na oncogênese (Barker et al., 2000).

A perda das cateninas, como da E-caderina, altera a adesão intercelular e interfere na manutenção do fenótipo epitelial, sendo também estudadas como marcadores de prognóstico em oncologia.

No CUTUS a perda da expressão de β -catenina já foi demonstrada como um fator independente de progressão tumoral e sobrevida livre de doença (Izquierdo et al., 2009). Entretanto em outro trabalho esta mesma molécula não demonstrou nenhuma significância prognóstica para essa mesma neoplasia (Kashibuchi et al., 2006). Devido às contradições da literatura, novos estudos

também são necessários para desvendar o papel dessa molécula de adesão no carcinoma urotelial do trato urinário superior.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Analisar a expressão da E-caderina e cateninas por imuno-histoquímica em pacientes com carcinoma urotelial do trato urinário superior submetidos à cirurgia e correlacionar essa expressão com:

- 1- Fatores clínicos e patológicos prognósticos clássicos de CUTUS
- 2- A sobrevida livre de doença.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Avaliamos retrospectivamente 20 pacientes com CUTUS tratados com nefroureterectomia ou ureterectomia com intenção curativa entre junho de 1997 e janeiro de 2007. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, Prof. Miguel Srougi e o acompanhamento se deu de modo padronizado pela sua equipe. Os dados clínicos e demográficos foram obtidos através de análise de prontuários e estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos pacientes

Pacientes (n=20)	
Idade (anos)	
Mediana	66,5
Mínimo – Máximo	52-85
Sexo	
Feminino	4 (20%)
Masculino	16 (80%)
Estadio patológico	
pTa-pT1	7 (35%)
pT2-pT3	13 (65%)
Tamanho do tumor	
≤3	6 (30%)
>3	14 (70%)
Multicêntrico	
Sim	5 (25%)
Não	15 (75%)
Grau	
Alto	15 (75%)
Baixo	5 (25%)
Invasão Microvascular	
Sim	10 (50%)
Não	10 (50%)
Recorrência	
Sim	10 (50%)
Não	10 (50%)

3.2 Microarranjo tecidual

A expressão das MAC foi avaliada através de IH pela técnica de microarranjo tecidual ou “tissue microarray” (TMA). O TMA é uma coleção organizada de amostras teciduais dispostas sob a forma de uma matriz, onde cada amostra é suficientemente grande para ser representativa, e convenientemente pequena para permitir o uso não predatório do bloco doador, permitindo utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas. A maior vantagem do TMA reside na análise simultânea de vários cortes histológicos arranjados em apenas uma lâmina.

O primeiro passo da confecção do TMA é a separação dos blocos de parafina contendo o CUTUS e sua respectiva lâmina corada em hematoxilina-eosina. A lâmina é analisada em microscópio óptico para localização e marcação da área representativa do tumor a ser amostrada. Por justaposição da lâmina com o respectivo bloco, marca-se neste último a área de interesse (bloco doador).

No próximo passo emprega-se aparelho específico que através de agulha coleta uma amostra pequena de tecido da área marcada do bloco de parafina doador e o insere no bloco receptor. Em nosso estudo empregamos um sistema mecanizado de precisão da marca Beecher que coleta cilindros de 1mm de diâmetro e os insere no bloco receptor em intervalos de 0,3mm.

O procedimento é repetido para cada paciente até que no final do procedimento centenas de espécimes estarão representados no bloco receptor

(Figura 2). Cada cilindro amostral é alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, e o conjunto das amostras constitui o que se denomina de TMA (Moch et al., 1999).

Figura 2. Bloco receptor do TMA contendo os cilindros com as amostras do tecido a ser estudado

O bloco do TMA é então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3 μm . Na sequência as lâminas são preparadas de acordo com a técnica a ser adotada, seja coloração hematoxilina-eosina, imunohistoquímica ou testes de hibridização.

A importância do TMA é que ele permite a avaliação da expressão de uma proteína em inúmeros casos em uma única reação, o que confere homogeneidade a avaliação, uma vez que todos os espécimes foram preparados e avaliados em condição idêntica. As vantagens do método são a rapidez na análise de múltiplos casos, economia de reagentes, praticidade e

uso não predatório do material evitando o desgaste e com isso permitindo o uso em outras pesquisas.

Entretanto a técnica possui algumas desvantagens que são a representação ausente ou inadequada, especialmente quando se trata de neoplasia heterogênea. A avaliação é limitada em relação a um caso específico, já que o método é voltado ao estudo de populações. Recomenda-se comumente a coleta de mais de um fragmento por caso, no intuito de menor perda de casos e maior representatividade (Hoos et al., 2001). Optamos por duas amostras por paciente, pois é comprovado que a análise IH de duas amostras em TMA é comparável ao observado na secção tecidual em 95% das vezes (Camp et al., 2000).

3.3 Imuno-histoquímica

A recuperação antigênica das amostras foi feita pelo calor utilizando tampão citrato (1 mM, pH 6,0) e aquecidas por 30 minutos em panela de pressão elétrica. As lâminas foram incubadas por uma noite a 4º C, com os anticorpos monoclonais especificados na Tabela 4. Para coloração foi utilizado o sistema LSAB (LSAB; Dako Cytomation, CA, E.U.A.). A coloração foi desenvolvida por uma solução substrato-cromógena 3,3'-diaminobenzidina, seguida por contracoloração com hematoxilina de Harris. As lâminas foram desidratadas, montadas com lamínulas e observadas em microscópio óptico.

Tabela 4: Anticorpos empregados no estudo imuno-histoquímico

Anticorpo	Fabricante	Diluição
E-cadherin	Dako Cytomation, CA, USA	1:50
β-catenin	BD (San Jose, CA, USA)	1:50
γ-catenin	Zymed	1:100
α-catenin	Santa Cruz (CA, USA)	1:100

A expressão dos anticorpos foi avaliada pela mesma patologista Dra. Katia R. M. Leite. A análise semiquantitativa foi realizada para todos os anticorpos, sendo que a expressão das MAC foi dividida em quatro grupos, de acordo com a maior intensidade da coloração das duas amostras: ausente 0, fraca: 1, moderada: 2 e forte: 3, conforme descrito por outros autores (Lourenço et al., 2004, Saha et al., 2008).

3.4 Análise estatística

Para responder aos objetivos do estudo, foram descritos cada fator clínico e patológico prognóstico da doença e o sexo dos pacientes com uso de frequências absolutas e relativas e verificadas a existência de associação dessas medidas com a expressão de cada proteína com uso de teste da razão de verossimilhanças ou teste exato de Fisher (Kirkwood e Sterne, 2006). Para descrever as idades segundo cada expressão das proteínas foram utilizadas medidas resumo (média, desvio padrão) a comparação entre as idades e os níveis de expressão de cada proteína foi feita com o uso do teste de ANOVA

ou o teste t-student (Kirkwood e Sterne, 2006) quando a expressão apresentou apenas dois níveis.

Para verificar se os fatores prognósticos da doença e a expressão das proteínas relacionaram-se com a sobrevida livre de doença foram construídos os gráficos de sobrevida por função Kaplan-Meier (Kleinbaum, 1996) com as estimativas dos tempos médios e medianos e comparados os tempos entre as categorias com uso de testes de Breslow ou testes log-rank (Kleinbaum, 1996) quando aplicáveis. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

3.4 Ética

Todas as amostras deste estudo foram codificadas para a garantia da confidencialidade. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da USP, sendo aprovado sob o processo nº 0720/09.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 E-caderina

A expressão de E-caderina foi avaliada como negativa, fraca, moderada e forte. As variáveis estágio patológico, grau, invasão microvascular, localização multicêntrica e tamanho não apresentaram diferenças estatísticas significantes ($p=0,626$; $p=0,493$; $p=0,565$; $p=0,354$; $p=0,348$) (Tabela 5). Ao analisar a recorrência tumoral, a expressão de E-caderina apresentou significância do ponto de vista estatístico, sendo que pacientes que recorreram possuíam uma expressão de E-caderina forte em 85,7% dos casos ($p=0,014$) (Figura 3).

Figura 3. (A) Expressão forte e difusa com padrão de membrana de E-Caderina em carcinoma urotelial de alto grau invasivo de trato urinário superior. (B) Expressão de E-Caderina presente apenas nas porções superficiais de carcinoma urotelial de baixo grau.

Tabela 5. Expressão de E-caderina de acordo com as variáveis clínico-patológicas de CUTUS.

E caderina											
Variável	Ausente		fraco		moderado		Forte		Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	
Sexo											0,774
F	0	0,0	1	25,0	1	12,5	2	28,6	4	20,0	
M	1	100,0	3	75,0	7	87,5	5	71,4	16	80,0	
Estádio											0,626
T1	0	0,0	1	25,0	3	37,5	1	14,3	5	25,0	
T2	0	0,0	1	25,0	0	0,0	2	28,6	3	15,0	
T3	1	100,0	2	50,0	4	50,0	4	57,1	11	55,0	
T4	0	0,0	0	0,0	1	12,5	0	0,0	1	5,0	
Grau											0,493
Baixo	0	0,0	1	25,0	1	12,5	3	42,9	5	25,0	
Alto	1	100,0	3	75,0	7	87,5	4	57,1	15	75,0	
IMV											0,565
Não	0	0,0	2	50,0	5	62,5	3	42,9	10	50,0	
Sim	1	100,0	2	50,0	3	37,5	4	57,1	10	50,0	
Recidiva											0,014
Não	0	0,0	4	100,0	4	50,0	1	14,3	9	45,0	
Sim	1	100,0	0	0,0	4	50,0	6	85,7	11	55,0	
Multicêntrico											0,354
Não	0	0,0	3	75,0	6	75,0	6	85,7	15	75,0	
Sim	1	100,0	1	25,0	2	25,0	1	14,3	5	25,0	
Tamanho do maior											0,348
<= 3	0	0,0	2	50,0	1	12,5	3	42,9	6	30,0	
> 3	1	100,0	2	50,0	7	87,5	4	57,1	14	70,0	
Total	1	100	4	100	8	100	7	100	20	100

Figura 4: Expressão de E-caderina de acordo com recorrência tumoral. Percentual de recidiva maior entre os pacientes com expressão forte para esta proteína ($p=0,014$)

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com as expressões das moléculas de adesão; pacientes com expressão moderada de E-caderina evidenciaram uma maior sobrevida livre de progressão (83,9 meses), comparado com os pacientes que apresentavam expressão forte (49,14 meses) ($p=0,011$). Expressão ausente foi identificada em apenas um paciente que sofreu recidiva em apenas 11 meses.

Figura 5: Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de E-caderina .

4.2 γ -catenina

A expressão de γ -catenina foi avaliada como fraca, moderada e forte, pois nenhum paciente apresentou expressão negativa para esta proteína. Quando comparamos a expressão de γ -catenina com as variáveis tamanho do tumor, multcentralidade, estágio patológico, grau e invasão microvascular, não encontramos diferenças estatísticas significantes ($p=0,120$; $p=0,170$; $p=0,612$; $p=0,119$; $p=0,282$) (Tabela 6). Quanto a análise de recorrência tumoral, observamos uma diferença marginal do ponto de vista estatístico, sendo que os pacientes com tumores com expressão moderada demonstraram sobrevida livre de doença de 99,3 meses, comparado a 38,5 meses naqueles com expressão fraca e 43,5 meses daqueles com expressão forte ($p=0,071$).

Figura 6. (A) Expressão moderada de γ -catenina em carcinoma de baixo grau. Nesta imagem é interessante a expressão nuclear da proteína. (B) Ausência de expressão de γ -catenina em carcinoma de alto grau invasivo.

Tabela 6. Expressão de γ -catenina de acordo com as variáveis clínico

	y catenina								
Variável	Fraco		moderado		forte		Total		p
	n	%	N	%	n	%	N	%	
Sexo									>0,999
F	1	20,0	2	20,0	1	20,0	4	20,0	
M	4	80,0	8	80,0	4	80,0	16	80,0	
Estádio									0,612
T1	1	20,0	2	20,0	2	40,0	5	25,0	
T2	1	20,0	1	10,0	1	20,0	3	15,0	
T3	2	40,0	7	70,0	2	40,0	11	55,0	
T4	1	20,0	0	0,0	0	0,0	1	5,0	
Grau									0,119
Baixo	1	20,0	1	10,0	3	60,0	5	25,0	
Alto	4	80,0	9	90,0	2	40,0	15	75,0	
IMV									0,282
Não	2	40,0	4	40,0	4	80,0	10	50,0	
Sim	3	60,0	6	60,0	1	20,0	10	50,0	
Recidiva									0,071
Não	1	20,0	7	70,0	1	20,0	9	45,0	
Sim	4	80,0	3	30,0	4	80,0	11	55,0	
Multicêntrico									0,170
Não	3	60,0	7	70,0	5	100,0	15	75,0	
Sim	2	40,0	3	30,0	0	0,0	5	25,0	
Tamanho do maior									0,120
<= 3	0	0,0	4	40,0	2	40,0	6	30,0	
> 3	5	100,0	6	60,0	3	60,0	14	70,0	
Total	5	100	10	100	5	100	20	100	

Também foi construída curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de γ -catenina; Não foram encontradas diferenças estatísticas na sobrevida livre de recidiva, porém encontramos uma diferença marginal onde os pacientes com expressão fraca e forte possuíam uma menor sobrevida livre de recidiva comparada com os pacientes que apresentavam expressão moderada ($p=0,053$).

Figura 7. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de γ -catenina.

4.3 α -catenina

A expressão de α -catenina foi considerada como negativa, fraca, moderada e forte, e correlacionada com os fatores prognósticos clássicos de CUTUS. Os pacientes que apresentavam tumores maiores que 3 cm, a expressão de α -catenina foi negativa em 100% dos casos ($p=0,003$). Não encontramos diferenças significativas do ponto de vista estatístico quando comparamos a expressão dessa proteína com a multicentricidade do tumor, estágio patológico, grau histológico, invasão microvascular e recorrência tumoral ($p=0,149$; $p=0,362$; $p=0,412$; $p=0,569$; $p=0,465$) (Tabela 7).

Tabela 7. Expressão de α -catenina de acordo com as variáveis clínico-patológicas de CUTUS e recorrência tumoral.

α catenina											
Variável	Ausente		fraco		moderado		forte		Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sexo											0,086
F	1	9,1	2	40,0	0	0,0	1	100,0	4	20,0	
M	10	90,9	3	60,0	3	100,0	0	0,0	16	80,0	
Estadio											0,362
T1	4	36,4	0	0,0	1	33,3	0	0,0	5	25,0	
T2	1	9,1	2	40,0	0	0,0	0	0,0	3	15,0	
T3	6	54,5	2	40,0	2	66,7	1	100,0	11	55,0	
T4	0	0,0	1	20,0	0	0,0	0	0,0	1	5,0	
Grau											0,412
Baixo	3	27,3	2	40,0	0	0,0	0	0,0	5	25,0	
Alto	8	72,7	3	60,0	3	100,0	1	100,0	15	75,0	
IMV											0,569
Não	6	54,5	3	60,0	1	33,3	0	0,0	10	50,0	
Sim	5	45,5	2	40,0	2	66,7	1	100,0	10	50,0	
Recidiva											0,465
Não	4	36,4	2	40,0	2	66,7	1	100,0	9	45,0	
Sim	7	63,6	3	60,0	1	33,3	0	0,0	11	55,0	
Multicêntrico											0,149
Não	9	81,8	3	60,0	3	100,0	0	0,0	15	75,0	
Sim	2	18,2	2	40,0	0	0,0	1	100,0	5	25,0	
Tamanho do maior											0,003
<= 3	0	0,0	3	60,0	2	66,7	1	100,0	6	30,0	
> 3	11	100,0	2	40,0	1	33,3	0	0,0	14	70,0	
Total	11	100	5	100	3	100	1	100	20	100	

Foi construída uma curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de α -catenina e não se encontrou diferença estatística no tempo de sobrevida livre de recidiva, de acordo com os níveis de expressão por IH ($p=0,913$). A média de sobrevida livre de recidiva foi de 68,4 meses na ausência de expressão, de 66,3 meses na fraca expressão e de 60,7 meses na expressão moderada de α -catenina.

Figura 8. Curva de Kaplan-Meier demonstrando tempo de sobrevida livre de recidiva segundo a expressão de α -catenina.

4.4 β -catenina

Em nossa casuística todos os pacientes apresentaram expressão de β -catenina negativa ou fraca, nenhum paciente foi caracterizado com tendo expressão moderada ou forte. Analisando os fatores prognósticos, não encontramos nenhuma associação significativa entre a expressão de β -catenina e o tamanho tumoral ($p>0,999$), multicentralidade do tumor ($p>0,999$), estágio patológico ($p=0,859$), grau histológico ($p=0,249$), invasão microvascular ($p=0,582$) ou recorrência ($p>0,999$) (Tabela 8).

Também foi construída uma curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de B-catenina. Não foram encontradas diferenças estatísticas no tempo de sobrevida livre de recidiva, de acordo com a expressão desta proteína. Nos casos de ausência de expressão a média de sobrevida livre de recidiva foi de 69,2 meses e para a expressão fraca foi de 66,2 meses ($p=0,913$).

Tabela 8. Expressão de β -catenina de acordo com as variáveis clínico-patológicas de CUTUS

β catenina						
Variável	ausente		Fraco		Total	P
	N	%	n	%	n	%
Sexo	>0,999					
F	3	18,8	1	25,0	4	20,0
M	13	81,3	3	75,0	16	80,0
Estadio	0,859*					
T1	4	25,0	1	25,0	5	25,0
T2	2	12,5	1	25,0	3	15,0
T3	9	56,3	2	50,0	11	55,0
T4	1	6,3	0	0,0	1	5,0
Grau	0,249					
Baixo	3	18,8	2	50,0	5	25,0
Alto	13	81,3	2	50,0	15	75,0
IMV	0,582					
Não	7	43,8	3	75,0	10	50,0
Sim	9	56,3	1	25,0	10	50,0
Recidiva	>0,999					
Não	7	43,8	2	50,0	9	45,0
Sim	9	56,3	2	50,0	11	55,0
Multicêntrico	>0,999					
Não	12	75,0	3	75,0	15	75,0
Sim	4	25,0	1	25,0	5	25,0
Tamanho do maior	>0,999					
<= 3	5	31,3	1	25,0	6	30,0
> 3	11	68,8	3	75,0	14	70,0
Total	16	100	4	100	20	100

Figura 9. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de β -catenina.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Associamos a expressão das MAC com o prognóstico do CUTUS em pacientes submetidos à cirurgia e demonstramos que as expressões positivas por IH dos anticorpos anti-E-caderina têm importância prognóstica e pode identificar os pacientes com maior risco de recorrência tumoral após a cirurgia.

Argumenta-se que a identificação prévia dos pacientes que sofrerão recidivas antes que ocorra a recorrência clínica possibilitaria o emprego do tratamento adjuvante em momento precoce, provavelmente melhorando a evolução desses pacientes. Por esse motivo, o conhecimento dos fatores que contribuem para o prognóstico do CUTUS é de primordial importância.

O estabelecimento de biomarcadores que reflitam funções biológicas cruciais na oncogênese, tais como ciclo celular, adesão e motilidade celular permitiriam melhor avaliação prognóstica, existindo evidências de que alterações na expressão das MAC estejam relacionadas a esses eventos.

Alterações na expressão de MAC foram descritas no CUTUS (Fromont et al., 2005), porém os eventos moleculares responsáveis por essas mudanças e suas consequências ainda permanecem incertos.

O ponto mais importante de nosso trabalho foi à associação entre expressão positiva de E-caderina com recorrência tumoral. Dos tumores com expressão forte de E-caderina, 85,7% sofreram recidiva contra 50,0% daqueles com expressão moderada ($p=0,014$). Nossos achados se opõem aos de Fromont et al. (2005) que demonstraram que a expressão fraca de E-caderina correlacionou-se com recorrência do CUTUS em pacientes com tumores não-invasivos de baixo grau. Por outro lado, em outro estudo o uso da E-caderina

como marcador prognóstico do CUTUS foi considerado limitado (Nakanishi et al., 1997).

Quando avaliamos a sobrevida livre de recidiva notamos que os pacientes que apresentavam expressão moderada de E-caderina apresentavam uma sobrevida média de 83,9 meses, enquanto aqueles que apresentavam expressão forte apresentavam sobrevida de 49,1 meses ($p=0,011$). A ausência de expressão foi identificada em apenas um paciente que recidivou em 11 meses, sendo difícil a interpretação desse resultado por constituir-se de apenas um elemento na variável. Este mesmo padrão de expressão foi encontrado em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo no carcinoma urotelial da bexiga (Guimarães et al., Tese de Doutorado, 2007).

A transição epitélio-mesenquimal consiste em programa biológico necessário para a aquisição de características malignas pelas células epiteliais neoplásicas e está relacionada à perda da adesão celular. Esse fenômeno é caracterizado pela perda do fenótipo epitelial normal e surgimento de condição de arranjo celular frouxo, de padrão mesenquimal, que apresenta maior potencial de migração, sendo considerado um passo essencial no processo de metastatização. Em nossa série encontramos uma associação entre a expressão positiva de E-caderina e recidiva tumoral. Entretanto, a perda de E-caderina é considerada como uma alteração participante do fenômeno da transição epitélio-mesenquimal observado em diversas neoplasias (Ke et al., 2008).

Alguns autores, apesar de concordarem que a redução da expressão da E-caderina no tumor seja importante para a invasão e disseminação da

neoplasia, postulam que para ocorrer a colonização e o crescimento das metástases à distância, seria necessária a re-expressão da E-caderina para níveis maiores do que o observado no tumor primário (DeMarzo et al., 1999, Saha et al., 2008). Esta hipótese torna-se factível se acreditarmos que a perda de expressão ocorre de forma temporária através de um mecanismo epigenético reversível, como por exemplo, a hipermetilação da área promotora do gene (Ribeiro-Filho et al., 2002). Esta hipótese pode explicar nossos achados no presente estudo.

As cateninas são MAC que também atuam na manutenção da integridade epitelial e a perda de sua expressão interfere na adesão intercelular, mesmo se a E-caderina estiver presente, influenciando na carcinogênese. Por isto o estudo em conjunto do padrão de expressão das cateninas e caderinas é importante.

Avaliamos a expressão de α , β e γ catenina. De acordo com a expressão de γ -catenina, encontramos que dos pacientes que exibiam expressão fraca ou forte, 80% recidivaram contra apenas 30% daqueles que exibiam expressão moderada ($p=0,071$). Embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ela constitui um dado biológico interessante para o CUTUS. Kashibuchi et al. (2006), também não encontraram diferenças estatísticas comparando a expressão de γ -catenina com os fatores prognósticos clássicos do CUTUS e com recidiva. No câncer de bexiga, a diminuição da expressão de γ -catenina já foi associada como um preditor independente de sobrevida livre de progressão (Lascombe et al., 2006). Podemos especular que a fraca expressão se deve a perda da molécula levando a desintegração do complexo protéico que mantém a integridade da junção epitelial, enquanto a expressão

forte deve-se a um efeito reativo, onde o aumento da expressão protéica resulta de uma tentativa de manter o complexo frente a uma perda dos demais componentes. Dos cinco casos que apresentaram forte expressão, quatro evidenciaram perda completa de expressão de α -catenina e β -catenina e um caso apenas apresentou fraca expressão de ambos. A expressão moderada seria uma medida de normalidade de todo complexo de moléculas de adesão, garantindo a aderência célula-célula relacionada a melhor sobrevida livre de recidiva.

Para α -catenina encontramos uma associação de sua expressão com tamanho tumoral, pacientes que apresentavam tumores maiores que três cm. não expressaram α -catenina em 100,0% dos casos ($p=0,003$). A ausência dessa catenina então pode ser correlacionada com pior prognóstico do CUTUS. Esse é o primeiro estudo que demonstra essa diminuição da expressão de cateninas com pior prognóstico do CUTUS. Em outras neoplasias, como no câncer de bexiga essa, menor expressão já foi correlacionada com pior prognóstico. Kashibichi et al., 2007, postulam que a α -catenina pode ser uma molécula chave que determina a quimiosensibilidade em pacientes com câncer de bexiga invasivo.

Quando avaliamos a expressão de β -catenina não encontramos nenhuma associação com fatores prognósticos, embora esta unidade das cateninas seja a mais estudada em CUTUS. Além de seu papel na adesão celular, essa catenina atua na proliferação celular. Além disso, é a única que já foi demonstrada como sendo um fator independente de progressão tumoral em CUTUS (Izquierdo et al., 2008). A não-associação dessa proteína em nosso trabalho com recorrência ou com os demais fatores prognósticos, pode ser

explicada pelo fato de que em nossa casuística não possuíamos nenhum paciente apresentando expressão forte ou moderada de β -catenina, todos foram considerados negativos ou fracos. Além disso, nosso TMA foi composto por 20 pacientes, talvez um número maior de amostras confirmasse o papel dessa molécula de adesão como um marcador prognóstico do CUTUS.

Atualmente, existem poucos estudos que tenham associado todas estas MAC em amostras clínicas como marcadores de prognóstico; a maioria dos estudos em CUTUS, especialmente em relação à E-caderina, concentra-se principalmente na descrição de expressão, poucos correlacionam estes dados com a recorrência tumoral (Kashibuchi et al., 2006).

Por essa razão, um aspecto importante de nossa pesquisa é que este é o primeiro estudo na literatura que correlacionou a expressão de E-caderina e cateninas com prognóstico do CUTUS. Outro ponto forte é a realização dos procedimentos e acompanhamento pela mesma equipe cirúrgica, o que diminui a influência das variáveis relacionadas ao tratamento cirúrgico, acompanhamento clínico, condutas, etc. A análise da expressão de cada marcador simultaneamente em todas as amostras através do TMA também colabora para a homogeneidade dos resultados.

Dentre as limitações de nosso estudo, são aqueles inerentes a qualquer estudo retrospectivo, o que qualifica o nosso resultado como gerador de hipótese. Além disso, reconhecemos também que o tamanho de nossa amostragem é pequeno, porém o carcinoma urotelial do trato urinário superior é uma neoplasia rara, o que justifica o nosso número amostral.

Existe a necessidade da validação dos nossos resultados através de estudos prospectivos com outras séries de casos e com o emprego de outras metodologias de análise de expressão das MAC.

Caso esses resultados sejam confirmados, eles poderão ser aplicados na prática clínica para melhorar a avaliação do prognóstico dos pacientes com CUTUS. Em combinação com outros testes moleculares, os testes de expressão para a E-caderina e α -catenina poderão ajudar a identificar e selecionar os pacientes com maiores chances de recorrência e com pior prognóstico, que podem então ser submetidos a tratamento adjuvante ou sofrerem uma vigilância mais próxima.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Demonstramos que a imuno-expressão forte da E-caderina está associada com maior recidiva e à menor sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma urotelial do trato urinário superior. Também mostramos pela primeira vez na literatura que a ausência de expressão de α -catenina está associada com maior tamanho tumoral, sugerindo que esta molécula de adesão seja um potencial marcador de pior prognóstico nessa neoplasia.

Anexos

ANEXO

Casos	Idade	Sexo	Estádio	Grau	IMV	Recorrência	E caderina	B catenina	γ catenina	α catenina
1	85	M	T2	alto	1	0	1	0	2	1
2	78	F	T3	alto	1	0	1	0	2	3
3	65	M	T1	alto	0	0	2	0	3	0
4	78	M	T1	alto	0	0	2	0	2	2
5	59	M	T3	alto	0	1	2	0	1	0
6	71	M	T3	alto	1	0	2	0	2	0
7	77	M	T3	alto	1	1	3	0	2	2
8	59	F	TA	alto	0	0	2	1	2	1
9	82	M	T3	alto	1	0	3	1	2	2
10	64	M	T3	alto	1	1	3	0	2	0
11	53	M	T1	baixo	0	0	1	0	1	0
12	52	M	T1	baixo	0	1	2	0	2	0
13	73	M	T3	alto	1	1	0	0	1	0
14	53	M	T1	baixo	0	1	3	1	3	0
15	56	M	T3	alto	0	0	1	0	2	0
16	63	F	TA	baixo	0	1	3	0	3	1
17	68	M	T2	baixo	0	1	3	1	3	1
18	59	F	T2	alto	1	1	3	0	1	0
19	74	M	T4	alto	1	1	2	0	1	1
20	76	M	T3	alto	1	0	2	0	3	0

Referências

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott A. Gene centre chips in with better route to microarrays.[news] Nature. 2002; 420:3.

Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. Lab Invest 1993;68:4-17.

Babaian RJ, Grunow WA. Reliability of Gleason grading system in comparing prostate biopsies with total prostatectomy specimens. Urology. 1985; 25:564-7.

Barker N, Morin PJ, Clevers H. The Yin-Yang of TCF/ β catenin signaling. Adv Cancer Res. 2000;77:1-14.

Brookland RK, Richter MP. The postoperative irradiation of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. J Urol. 1985; 133:952-5.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest. 2000; 80:1943-9.

Catton C, Davis A, Bell R, O'Sullivan B, Fornasier V, Wunder J, McLean M. Soft tissue sarcoma of the extremity. Limb salvage after failure of combined conservative therapy. Radiother Oncol. 1996; 41:209-14.

Clark PE, Klein EA. Surgery for invasive bladder tumors: technique and outcome. Curr Opin Urol. 1999; 9:413-8.

Cozad SC, Smalley SR, Austenfeld M, Noble M, Jennings S, Raymond R. Transitional cell carcinoma of the renal pelvis or ureter: patterns of failure. Urology. 1995; 46:796-800.

Davis BW, Hough AJ, Gardner WA. Renal pelvic carcinoma: morphological correlates of metastatic behavior. J Urol. 1987; 137: 857-61.

De Marzo AM, Knudsen B, Chan-Tak K, Epstein JI. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processes radical prostatectomy specimens. Urology.1999; 53: 707-713.

Elliot TL, Downey DB, Tong S, McLean CA, Fenster A. Accuracy of prostate volume measurements in vitro using three-dimensional ultrasound. *Acad Radiol*. 1996 ;3:401-6.

Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002; 29:15-8.

Fromont G, Rouprêt M, Amira N, Sibony M, Vallancien G, Validire P, Cussenot O. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur Urol*. 2005; 48:764-70.

Gill CJ. Health professionals, disability, and assisted suicide: an examination of relevant empirical evidence and reply to Batavia. *Psychol Public Policy Law* 2000; 6:526-45.

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 55:5195-5199.

Greene FL. The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. *Bull Am Coll Surg*. 2002; 87:13-5.

Grossman E. Incentives to reduce absenteeism. *Dimens Health Serv*. 1978; 55:26-7.

Hall MC, Womack S, Sagalowsky AI, Carmody T, Erickstad MD, Roehrborn CG. Prognostic factors, recurrence, and survival in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: a 30-year experience in 252 patients. *Urology* 1998 ; 52:594-601.

Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158, 1245-125.

Huben RP, Mounzer AM, Murphy GP. Tumor grade and stage as prognostic variables in upper tract urothelial tumors. *Cancer* 1988; 62: 2016-20.

Izquierdo L, Mengual L, Gazquez C, Ingelmo-Torres M, Alcaraz A. Molecular characterization of upper urinary tract tumours. *BJU Int.* 2010; 106: 868-72.

Jabbour ME, Smith AD. Primary percutaneous approach to upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* 2000; 27:739-50.

Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. Epub 2011 Feb 4.

Global cancer statistics.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.

Jemal M, Xia Y. Development Strategies for Quantitative Bioanalysis. *Current Drug Metabolism* 2006; 7: 491-502.

Johanson IB. Thermotaxis in neonatal rat pups. *Physiol Behav.* 1979; 23:871-4.

Johnson DE, Babaian RJ. Conservative surgical management for noninvasive distal ureteral carcinoma. *Urology* 1979; 13:365-7.

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

Ke XS, Goldfinger N, Rostad K, Hovland R, Akslen LA, Rotter V. Epithelial to mesenchymal transition of a primary prostate cell line with switches of cell adhesion modules but without malignant transformation. *PLoS One* 2008;3:e3368.

Keeley FX Jr, Bagley DH. Adjuvant mitomycin C following endoscopic treatment of upper tract transitional cell carcinoma. *J Urol.* 1997;158:2074-7.

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

Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB. Mutational analysis of ETV6 in prostate carcinoma. *Prostate*. 2002; 52: 305-10.

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd. Oxford: Blackwell Science; 2003. p. 429-46.

Kleinbaum D. 1996. *Survival Analysis*. New York: Springer-Verlag.

Lancini V, Liatsikos EN, Bernardo NO, Dinlenc CZ, Kapoor R, Smith AD. Endourologic treatment of transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Minerva Urol Nefrol*. 2000; 52: 17-28.

Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B, Bittard H. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 2780-7.

Li LC, Zhao H, Nakajima K, Ryoul B, Ribeiro Filho LA, Carroll P, Dahiya R. Methylation of the E-cadherin gene promoter correlates with progression of prostate cancer. *J Urol*. 2001; 166: 705-709.

Lourenço SV, Kapas S, Williams DM, Leite K, Araújo VC. Expression patterns of integrins on pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: study on specimens and in vitro investigation of the effects of extracellular matrix on the expression of these adhesion molecules. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:574-580.

Mazeman E. Tumours of the upper urinary tract calyces, renal pelvis and ureter. *Eur Urol*. 1976;2:120-6.

Michael KM, Drummond KJ, Sorby W, Grinnell V. Surgical management of dural arteriovenous malformations of the cranium. *J Clin Neurosci*. 1998; 5:318-22.

Mills KD, Deslaurier L, Dilworth DS, Grannell SM, Hoover BG, Athey BD, Leith EN. Investigation of ultrafast time gating by spatial filtering. *Appl Opt*. 2001; 40:2282-9.

Minimo C, Tawfiek ER, Bagley DH, McCue PA, Bibbo M. Grading of upper urinary tract transitional cell carcinoma by computed DNA content and p53 expression. *Urology*. 1997; 50:869-74.

Moch H, Schraml P, Rubendorf L, Mirlacher M, Kokonen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999; 154:981-6.

Morita N, Uemura H, Tsumatani K, Cho M, Hirao Y, Okajima E, *et al.* E-cadherin and alpha, β and gamma catenin expression in prostate cancer: Correlation with tumor invasion. *BJU Int* 1999;79:1879-83.

Munhoz JJ, Ellison LM. Upper tract urothelial neoplasms: incidence and survival during the last 2 decades. *J Urol*. 2000; 164:1523-5.

Murta BC; Antunes AA. Dall'Oglio FM, Mosconi A, Leite RK, Srougi M. Analysis of the clinicopathological characteristics of patients with upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Clinics* 2008;63:223-8.

Nakanishi K, Kawai T, Torikata C, Aurues T, Ikeda T. E-cadherin expression in upper urinary tract carcinoma. *Int J Cancer*. 1997; 74:446-9.

Park CH, Chang HS, Oh BR, Kim HJ, Sul CK, Chung SK, Jung SI. Efficacy of low-dose tamsulosin on lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia: A nonblind multicentre korean study. *Clinical Drug Investigation* 2004; 24: 41-47.

Petković SD. A plea for conservative operation for ureteral tumors. *J Urol*. 1972; 107:220-3.

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; 34:187-98.

Saha B, Arase A, Imam SS, Tsao-Wei D, Naritoku WY, Groshen S, Jones LW, Imam A. Overexpression of E-Cadherin and β -Catenin Proteins in Metastatic Prostate Cancer Cells in Bone. *The Prostate*. 2008 68:78-84.

Sarkis AS, Bajorin DF, Reuter VE, Herr HW, Netto G, Zhang ZF, Schultz PK, Cordon-Cardo C, Scher HI. Prognostic value of p53 nuclear overexpression in patients with invasive bladder cancer treated with neoadjuvant MVAC. *J Clin Oncol*. 1995; 13:1384-90.

Scher HI, Yagoda A, Herr HW, Sternberg CN, Morse MJ, Sogani PC, Watson RC, Reuter V, Whitmore WF Jr, Fair WR. Neoadjuvant M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for extravesical urinary tract tumors. *J Urol*. 1988; 139:475-7.

Smith JR, Connell SD, Swift JA. Stereoscopic display of atomic force microscope images using anaglyph techniques. *J Microsc*. 1999; 196:347-51.

Srougi M, Simon DS. Câncer Urológico ; São Paulo, Platina, 1990. 460p.

Sternberg CN, Pansadoro V. Muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder: strategies for bladder preservation. *Curr Opin Urol*. 1998; 8:431-5.

Stewart DA, Cooper CA, Sikes RA. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Repr Biol Endocr* 2:1-13, 2004.

Trindade JC. Allergic diseases and pediatric allergology in Portugal. *Pediatr Pulmonol*. 1999; 18 (suppl): 150-3

Van de Vijver MJ, He YD, van 't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New Engl J. Med* , 2002; 347: 1999-2009

Woodson K, Hayes R, Widroff L, Villaruz L, Tangrea J. Hypermethylation of GSTPI, CD44 and E-cadherin genes in prostate cancer among US blacks and whites. *The Prostate*. 2003; 55:199.

Zincke H, Neves RJ. Feasibility of conservative surgery for transitional cell cancer of the upper urinary tract. *Urol Clin North Am.* 1984; 11:717-24.