

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Moacyr Christopher Garces Gamarra Salem

**Avaliação da Expressão
Imunoistoquímica da E-caderina,
B-catenina, N-caderina, Vimentina e
CD44 no Processo de Transição
Epitélio-Mesenquimal e
Tumorigênese em Pacientes com
Carcinoma Urotelial de Bexiga de
Alto Grau**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2017**

Moacyr Christopher Garces Gamarra Salem

**Avaliação da Expressão
Imunoistoquímica da E-caderina,
B-catenina, N-caderina, Vimentina e
CD44 no Processo de Transição
Epitélio-Mesenquimal e
Tumorigênese em Pacientes com
Carcinoma Urotelial de Bexiga de
Alto Grau**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Vial Roehle

**Porto Alegre
2017**

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que, mesmo frente a todas as dificuldades, tentam contribuir, das mais diversas formas com o desenvolvimento da ciência visando sempre o bem maior – o cuidado com a vida.

Agradecimentos

À minha orientadora Prof^a. Dra. Adriana Roehe, pela oportunidade da realização de mais essa etapa de formação acadêmica. Obrigado pelo tempo dedicado, orientação, incentivo e paciência, ao longo desses anos, não somente no PPG-Patologia como também durante o período de graduação no curso de medicina na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Aos meus pais, Moacyr e Alejandrina, exemplos de integridade e dedicação, que sempre se fizeram presentes em todos os momentos e nunca mediram esforços para a realização dos nossos sonhos e objetivos. Obrigado também por sempre ensinar, que em primeiro lugar, a Educação é o maior presente que os pais podem deixar para os filhos.

À minha madrinha, Tia Nena (*In memorian*), que sempre esteve presente em todas as conquistas, como grande incentivadora para realização de nossos planos, mesmo que isso representasse a ausência física dos seus entes mais queridos.

Aos meus irmãos, Jonathan e Andressa, que sempre estiveram ao meu lado, e foram grande fonte de inspiração para a busca e concretização dos nossos sonhos, sob o incentivo de: *“nada é impossível”*.

À minha companheira Érika, por ter estado ao meu lado durante mais essa etapa, compartilhando todos os momentos de alegria e ansiedade durante a realização desse projeto. Agradeço também pela compreensão e carinho, pois, a continuidade da formação exige dedicação não somente do aluno como também do seu círculo familiar.

Ao amigo e Prof. Dr. Antonio A. Hartmann pelos ensinamentos ao longo desses anos e grande incentivador para a continuidade da minha formação acadêmica.

Ao amigo Guilherme Watte, que acompanhou todo o desenvolvimento do projeto, pela amizade, orientações e por sua grande colaboração para com a análise estatística do trabalho.

Ao Prof. Ms. Paulo Laste, pela parceria ao longo desses anos, que foi fundamental para a realização desse estudo.

As profissionais e amigos do laboratório de pesquisa em patologia da pós-graduação, Rosalva Meurer, Terezinha Stein e Keli Reiter pelo carinho, amizade e apoio na realização deste projeto, ao longo desses anos.

Às amigas Maristela Pasin e Luciani Spencer, pelo carinho, amizade e por acompanharem desde a graduação o caminho traçado para realização de mais esse objetivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, seus professores e funcionários.

Aos amigos do Programa de Residência Médica em Cirurgia Geral do Hospital Beneficência Portuguesa, Alicia, Rodrigo e Carla – que compartilharam a ansiedade durante o ano de 2016.

Finalmente, a todas as pessoas que ajudaram direta ou indiretamente e que não foram citadas mas contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

I.	Lista de Abreviaturas.....	VI
II.	Lista de Figuras da Revisão da Literatura.....	VIII
III.	Resumo da Dissertação	IX
1.	Introdução	11
1.1	Epidemiologia	11
1.2	Fatores de Risco.....	12
1.3	Fatores Prognósticos.....	13
1.3.1	Graduação.....	14
1.3.2	Estadiamento.....	16
1.4	Tratamento	19
2.	Iniciação e Progressão Tumoral	19
2.1	Transição Epitélio-Mesenquimal.....	20
2.2	Transição Epitélio-Mesenquimal e <i>Stemness</i>	23
2.3	<i>Stemness</i>	24
2.4	Transição Epitélio-Mesenquimal e Células-Tronco Tumorais.....	25
2.5	Marcadores de Superfície Celular.....	26
3.	Introdução a Caderinas	28
3.1	N-caderina.....	29
3.2	Vimentina.....	30
3.3	E-caderina.....	31
3.4	E-caderina nuclear.....	33
3.5	B-catenina.....	34
4.	Referências Bibliográficas.....	36
5.	Objetivos.....	49
6.	Artigo científico redigido em inglês.....	50
7.	Considerações finais	71
8.	Anexos.....	72

I. Lista de abreviaturas

APC	Adenomatose polipose coli
BCAT	B-catenina
CAUB	Carcinoma Urotelial de Bexiga
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CS	<i>Cadherin Switch</i>
CSC	Células-tronco tumorais
EAU	Associação Européia de Urologia
ECAD	E-caderina
EGF	Fator de crescimento epitelial
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISUP	Sociedade internacional de Patologia Urológica
ITH	Heterogeneidade intra-tumoral
MET	Transição mesenquimo-epitelial
MEC	Matriz extracelular
MIBC	Câncer de bexiga músculo invasor
MMPs	Metaloproteinases
NCAD	N-caderina
NCI	Instituto Nacional do Câncer
NMIBC	Câncer de bexiga não-músculo invasor
PUNLMP	Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial de malignidade
PCAD	P-caderina
RTU-B	Ressecção transuretral de bexiga

SIM	Serviço de Informação sobre Mortalidade
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TIC	Células de Iniciação Tumoral
TNM	Classificação de Tumores Malignos
VIM	Vimentina
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
WHO	Organização Mundial da Saúde
WNT	Via de sinalização WNT

II. Lista de Figuras da Revisão da Literatura

Figura 1 – Sistemas de graduação tumoral (WHO 1973 vs 2004)	15
Figura 2 – Estadiamento dos tumores uroteliais de bexiga	17
Figura 3 – Subtipos de Transição-Epitélio-Mesenquimal	22
Figura 4 – Dinâmica do processo EMT – MET.....	23
Figura 5 – Desenvolvimento tumoral a partir das CSC.....	24
Figura 6 – Expressão de NCAD no desenvolvimento tumoral.....	30
Figura 7 – Expressão de ECAD no desenvolvimento tumoral.....	32
Tabela 1 – Critérios para graduação em CAUB (WHO/ISUP – 2004).....	15
Tabela 2 – Classificação TNM (2009) para Câncer de Bexiga.....	18

III. Resumo da Dissertação

Introdução: Câncer de bexiga é o segundo tumor urológico mais comum e quando comparado a outros tumores, é o 5º com maior incidência e 7º em número de mortes em 2016.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas E-caderina (ECAD), B-catenina (BCAT), vimentina (VIM), N-caderina (NCAD) e CD44 em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga (CAUB) de alto-grau, assim como a sua relação com tempo de sobrevida, estadiamento tumoral e associação entre os marcadores.

Material e Métodos: Foram obtidas amostras de 34 pacientes com tumor de bexiga de alto-grau de natureza músculo-invasora, submetidos a cistectomia radical pelo Departamento de Urologia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, entre 2000 e 2004. Foi realizada a avaliação da expressão imunoistoquímica dos marcadores acima citados. Para a significância estatística foi adotado valor $P < 0,05$.

Resultados: A ECAD foi principalmente expressa em um padrão aberrante, com predominância de intensidade forte e moderada. A expressão nuclear de ECAD esteve presente em cerca de 61,8% dos casos, sendo associada à expressão aberrante/intensidade de ECAD, assim como imunorreatividade positiva para NCAD. A expressão de BCAT foi positiva em 29,4% dos casos, sendo associada a estadiamento tumoral (TNM). A expressão positiva de NCAD foi associada ao tempo de sobrevida em 2 anos (log rank test, $P < 0,05$). Não foram encontradas outras associações entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos e outras variáveis do estudo.

Conclusão: Apesar da concordância com a literatura em que há uma expressão aberrante dos diversos marcadores durante o processo da Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT), o padrão de imunorreatividade varia de acordo com a sua natureza. Foi evidenciada a expressão aberrante dos diversos marcadores epiteliais (ECAD e BCAT) juntamente com o aparecimento de marcadores mesenquimais (VIM e NCAD) e a associação desses eventos com tempo de sobrevida e estadiamento tumoral. Um dos fatores limitantes deste estudo é o tamanho amostral limitado. Apesar disso, o diferencial deste estudo é baseado no fato de que o grupo de participantes é composto por pacientes com doença avançada e o tempo de seguimento prolongado. Para obtenção de resultados mais consistentes, faz-se necessária a ampliação do número de marcadores imunohistoquímicos e de amostras nos próximos estudos.

Palavras-chave: Câncer de Bexiga, E-caderina, B-catenina, N-caderina, Vimentina, CD44, Transição-epitélio-mesenquimal, EMT

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Câncer de bexiga é o Segundo tumor urológico mais comum e quando comparado a outros tumores, é o 5º com maior incidência e 7º em número de mortes em 2016 (Dinney e cols., 2004; Wu, 2005; Chan e cols., 2009; *National Cancer Institute* (NCI), 2016).

Foram estimados cerca de 76.960 novos casos de câncer de bexiga e 16.390 mortes nos Estados Unidos em 2016. O número de mortes estimados em homens/mulheres a cada 100.000 habitantes é 7,7 / 2,2 (3,5 : 1 / 100.000), respectivamente, conforme dados do *National Cancer Institute* (NCI, 2016).

No Brasil (2016), estima-se 9.670 novos casos de câncer de bexiga (7.200 em homens e 2.470 em mulheres). Em 2013, ocorreram 3.642 mortes pela doença, sendo 2.542 em homens e 1.099 em mulheres, conforme registro do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM) e Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INCA, 2016).

A incidência do câncer de bexiga varia de acordo com idade e sexo, sendo mais prevalente em indivíduos entre 50 e 70 anos, em uma proporção de 3:1 em homens (Kaufman e cols., 2009).

1.2 FATORES DE RISCO

Os Fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de bexiga podem ser classificados em genéticos, ocupacionais e ambientais (Wu e cols., 2009; Pierzynski e cols., 2015).

Como exemplo pode-se citar:

a) tabagismo: é um dos fatores de risco bem determinados para carcinoma urotelial de bexiga (CAUB), sendo responsável por 50-65% dos casos em homens e 20-30% dos casos em mulheres (Freedman e cols., 2011);

b) produtos químicos industriais (corantes, borrachas, couros, têxteis, produtos de pintura): tumores de bexiga estão relacionados a fatores ocupacionais em cerca de 20-25% dos casos (Pashos e cols., 2002);

c) tratamentos prolongados com quimioterápicos, como ciclofosfamida;

d) radioterapia pélvica: é relacionada a um aumento do risco relativo para o desenvolvimento de tumores secundários em pacientes submetidos a radioterapia para tratamento de neoplasias ginecológicas (Chrouser e cols., 2006);

e) infecções crônicas do trato urinário: foi sugerido, ainda com ressalvas, que pacientes com casos de infecção de trato urinário crônicas apresentariam risco aumentado para desenvolvimento de câncer de bexiga (Pelucchi e cols., 2006);

f) fatores genéticos: em famílias com histórico de câncer, existe um risco aumentado para câncer de bexiga em parentes de primeiro-grau; esse risco se torna maior em pacientes jovens (Murta-Nascimento e cols., 2007);

1.3. FATORES PROGNÓSTICOS

Estudos prévios demonstraram que estadiamento e graduação tumorais são indicadores prognósticos, relacionados à recorrência, progressão e sobrevida em pacientes com câncer de bexiga. Outros fatores prognósticos incluem: multifocalidade, presença de invasão linfática e associação com carcinoma *in situ*. (Soloway e cols., 2003; Kashibuchi e cols., 2007; Hu e cols., 2011; SBOC, 2011).

Várias moléculas que estão envolvidas na transição epitélio-mesenquimal (EMT) podem ser úteis como indicadores prognósticos em pacientes com diferentes tipos de tumor, ex.: E-cadherina, vimentina, N-cadherina, β -catenina, γ -catenina, Slug, Snail, MMP-9, TWIST (Xu e cols., 2006; Voulgari e cols., 2009; Roussos e cols., 2010; Harada e cols., 2012; Liu e cols., 2014).

A EMT promove alteração dos mecanismos de adesão, plasticidade e motilidade celular, induzindo um fenótipo mesenquimal às células tumorais, conferindo-lhes características mais agressivas e invasoras (Thiery e cols., 2002; Baumgart e cols., 2007; Voulgari e cols., 2009; Kalluri e Weinberg, 2009; van der Horst e cols., 2012; McConkey e cols., 2009; Adam e cols., 2009; Roussos e cols., 2010; Kallergi e cols., 2011; Nijkamp e cols., 2011; Hur e cols., 2013; Nozato e cols., 2013).

Nos casos de CAUB, tanto graduação quanto estadiamento (TNM) tumorais são fatores prognósticos independentes, relacionados a doenças com padrão mais agressivo e invasor e com pior desfecho (Jemal e cols., 2009; SBOC, 2011).

A taxa de sobrevida em 5 anos para pacientes com estágio I (T1N0M0) e II (T2a,bN0M0) é maior do que 70%, enquanto que para estágio IV (superiores a T4N0M0) é inferior a 20% (SBOC, 2011).

Pacientes com CAUB de alto-grau apresentam uma doença de natureza mais agressiva e com um risco relativamente maior de recorrência e progressão (SBOC, 2011).

1.3.1 GRADUAÇÃO

Gradação tumoral consiste na avaliação do grau de anaplasia celular, analisando critérios morfológicos como aumento de celularidade, aglomeração e pleomorfismo nuclear, alteração do padrão de cromatina e presença anormal de figuras mitóticas (Mostofi e cols., 1973; Eble e cols., 2004; Cheng e cols., 2012). Existem dois tipos principais para sua classificação conforme a Organização Mundial da Saúde – “*World Health Organization*” (WHO): a) WHO – 1973; b) WHO/ISUP – 2004. Atualmente utiliza-se a classificação WHO/ISUP – 2004, entretanto, salienta-se a importância da classificação mais antiga devido ao fato de que a maioria dos estudos retrospectivos foram baseados na WHO – 1973 (Montironi e Lopez-Beltran, 2005; Miyamoto e cols., 2010; Cheng e cols., 2012).

O sistema de gradação WHO – 1973 classifica as lesões em: papiloma ou carcinomas, que podem ser categorizados em Grau I – bem diferenciado, Grau II – moderadamente diferenciado e Grau III – pouco diferenciado (van Rhijn e cols., 2009; Cao e cols., 2010).

O sistema de classificação 2004 WHO/ISUP (*World Health Organization/ International Society of Urological Pathology*) define neoplasias papilares uroteliais em quatro tipos: Papiloma, Neoplasia Urotelial de Baixo Potencial de Malignidade, Carcinoma Urotelial de Baixo e Alto Grau. Essa classificação

apresenta uma descrição detalhada da arquitetura tecidual e celular (Figura 1 e Tabela 1).

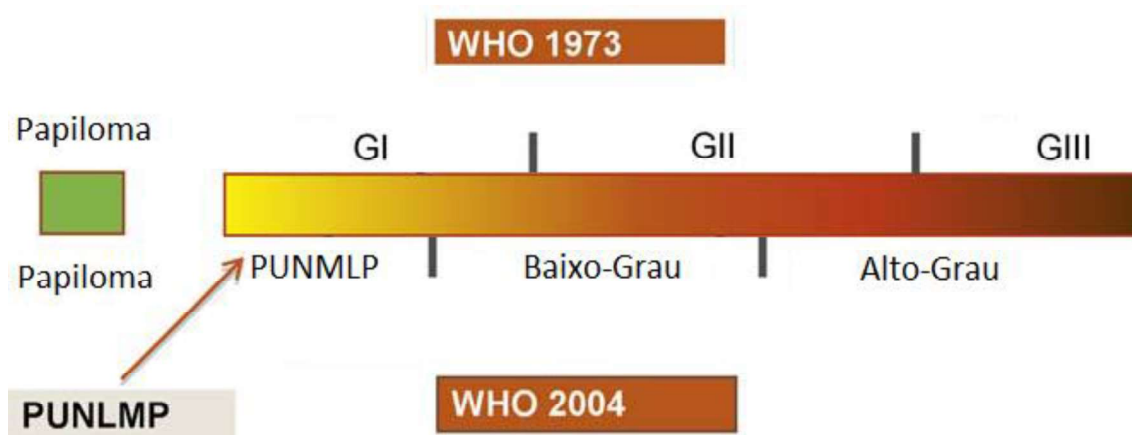


Figura 1 – Comparação entre os sistemas de graduação tumoral WHO 1973 vs 2004. A) PUNLMP: Neoplasia Urotelial Papilar de Baixo Potencial de Malignidade. Adaptado de: van Rhijn e cols., 2009.

Tabela 1 – Critérios histológicos para graduação em tumores uroteliais

	Papiloma	PUNLMP	Carcinoma Urotelial de Baixo Grau	Carcinoma Urotelial de Alto Grau
ARQUITETURA				
Papilas	Deliciada/Delicate	Delicadas; ocasionalmente fusionadas	Fusionadas; ramificadas; delicadas	Fusionadas; ramificadas; delicadas
Organização celular	Idêntica ao normal	Polaridade normal; Qualquer espessura; Coeso	Predominantemente organizadas com mínimas perda de polaridade; Qualquer espessura; Coeso	Predominantemente desorganizadas com frequente perda de polaridade; Qualquer espessura; Frequentemente perda da coesão

¹ Presença de nucléolos pequenos, regulares e sem identificação de parâmetros histopatológicos associados a Carcinomas de Alto Grau.

² PUNLMP, Neoplasia Urotelial Papilar de Baixo Potencial de Malignidade.

Adaptado de: Miyamoto e cols., 2010. *The 2004 WHO/ISUP classification system*.

Tabela 1 – Critérios histológicos para graduação em tumores uroteliais
(Continuação)

	Papiloma	PUNLMP	Carcinoma Urotelial de Baixo Grau	Carcinoma Urotelial de Alto Grau
CITOLOGIA				
Tamanho nuclear	Identica ao normal	Aumentados uniformemente	Aumentado, com alguma variação Arredondadas;	Aumentado, com alguma variação
Superfície nuclear	Identica ao normal	Aumentada, ovalada, uniforme	Olvaladas; Discretas variações no contorno	Pleomorfismo nuclear
Cromatina	Fina	Fina	Discretas variações	Hipercromasia
Nucleolos	Ausente	Discretos ou Ausentes	Normalmente discretos ¹	Multiplos nucleolos proeminentes Usualmente frequente, em qualquer nível; Podem ser atípicas
Figurias mitóticas	Ausente	Raras, basais	Ocasionalmente, em qualquer nível	
Células	Presente uniformemente	Presentes	Usualmente presente	Podem estar presente

¹ Presença de nucleolos pequenos, regulares e sem identificação de parâmetros histopatológicos associados a Carcinomas de Alto Grau.

² PUNLMP, Neoplasia Urotelial Papilar de Baixo Potencial de Malignidade.

Adaptado de: Miyamoto e cols., 2010. *The 2004 WHO/ISUP classification system*.

1.3.2. ESTADIAMENTO

Estadiamento tumoral consiste em avaliar o grau de disseminação da doença, levando em consideração não somente a sua taxa de crescimento, mas também a extensão da doença. Para isso são analisados: localização, tamanho ou volume do tumor, invasão vascular e linfática, metástases à distância, diagnóstico histopatológico, entre outros (Edge e cols., 2010).

A Invasão tumoral, mais especificamente, consiste no crescimento/desenvolvimento do tumor ultrapassando o limite da membrana

basal, chegando ao estroma/tecido conjuntivo, camada muscular e/ou estruturas adjacentes (Figura 2).

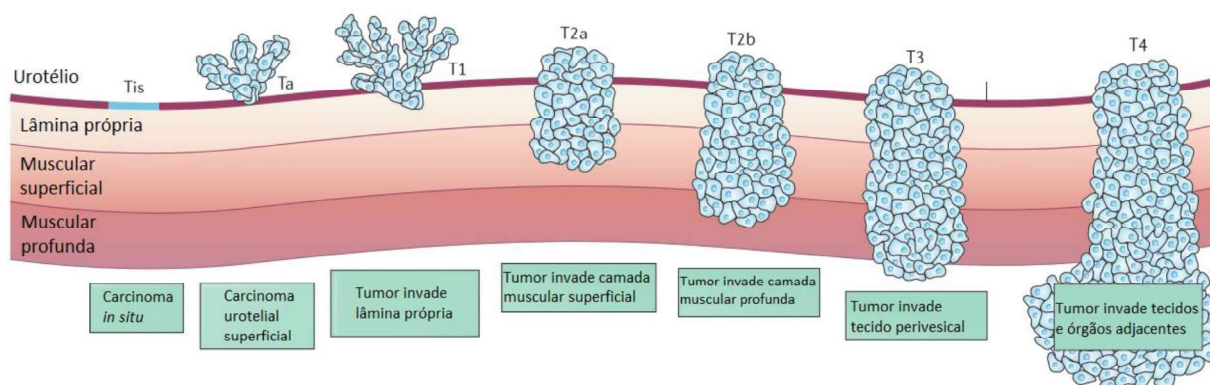


Figura 2 – Estadiamento dos tumores uroteliais de bexiga conforme classificação do sistema TNM (Tumour-Node-Metastasis). Adaptado de: Knowles e Hurst (2012).

Componentes celulares do estroma / matriz extracelular (MEC) contribuem para a progressão da doença por meio de mecanismos de sinalização celular, incluindo fatores de crescimento, indutores de angiogênese, expressão de metaloproteinases da matriz (Liotta e Kohn, 2001; Orlichenko e Radisky, 2008).

Aproximadamente 70% dos casos de câncer de bexiga se apresentam como tumores superficiais confinados na mucosa (Tis, Ta) ou que se estendem até a lâmina própria (T1). Tumores musculo-invasores (T2 – T4) correspondem aos 30% restantes dos casos (Kaufman e cols., 2009; Olivo e cols., 2012).

Tabela 2 – Classificação TNM (2009) para Câncer de Bexiga

T – Tumor Primário	
Tx	Tumor primário – não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : “Tumor plano”
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor que invade o músculo: T2a: Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna) T2b: Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido perivesical: T3a: Microscopicamente T3b: Macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: T4a: Tumor que invade próstata, útero ou vagina T4b: Tumor que invade parede pélvica ou abdominal
N - Linfonodos Regionais	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em um único linfonodo na pelve (hipogástrico, obturador, ílico externo ou presacral)
N2	Metástase em múltiplos linfonodos na pelve (hipogástrico, obturador, ílico externo ou presacral)

N3	Metástase em linfonodo da íliaca comum
M – Metástases à distância	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância

Adaptado de: *Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. European Association of Urology (2015).*

1.4. TRATAMENTO

Embora casos de câncer de bexiga não musculo-invasores possam ser tratados com abordagem menos agressivas comparados ao tratamento dos tumores musculo-invasores – ressecção transuretral/endoscópica x cistectomia radical, a sua recorrência varia entre 30% a 70%. Cerca de 30% desses tumores podem progredir para doenças musculo-invasoras ($\geq T2$) (Heney e cols., 1983; Millan-Rodriguez e cols., 2000; Hu e cols., 2013).

Pacientes acometidos com doença musculo invasora (T2 – T4) que foram submetidos a terapias mais agressivas, incluindo cistectomia radical, apresentam taxa de sobrevida em 5 anos entre 27% a 50% (Wallace e cols., 2002; Bryan e Tselepsi, 2010; Hu e cols., 2013).

2. INICIAÇÃO E PROGRESSÃO TUMORAL

Recentemente alguns conceitos como transição-epitélio-mesenquimal (EMT), *stemness*, “*cancer stem cell*” (CSC), tem sido utilizados para explicar as características de progressão tumoral e tentar prever possíveis desfechos como recorrência, progressão, metástase, resistência a quimioterapia e morte

(McConkey e cols., 2009; Adam e cols., 2009; Kalluri e Weinberg, 2009; Polyak e Weinberg, 2009; van der Pluijm, 2011; Garg, 2015).

Foi previamente demonstrada a influência da EMT na progressão da doença, sendo crucial a compreensão dos mecanismos moleculares que podem influenciar no desfecho do paciente, e com isso, indicar o melhor tratamento (Wu e cols., 2013).

EMT, CSC e *stemness* fazem parte de um complexo processo relacionado com iniciação e desenvolvimento tumoral, que ocorrem em resposta aos diversos mecanismos de sinalização celular que podem ocorrer tanto no local, quanto à distância. Esses mecanismos atuam tanto nas células tumorais quanto na matriz extracelular / estroma (MEC), onde, células epiteliais diferenciadas retornam a um estado menos diferenciado apresentando um fenótipo mesenquimal (desdiferenciação celular) (Xu e cols., 2006; Mani e cols., 2008; Voulgari e Pintzas, 2009; Thiery e cols., 2009; Kasper, 2009; Santisteban e cols., 2009; Zhang e cols., 2010; Harada e cols., 2012; Jiang e cols., 2016).

2.1 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

A EMT promove alteração do mecanismo de adesão celular na relação célula-célula e célula-MEC, conferindo à célula tumoral um fenótipo mesenquimal com características invasoras. Isso ocorre por meio da alteração da polaridade e plasticidade celular, diminuição da expressão de marcadores epiteliais e aumento ou ganho de expressão dos marcadores mesenquimais. O fenótipo invasor-mesenquimal contribui também para alteração da morfologia celular, motilidade, migração, resistência à apoptose e a quimioterápicos,

estimulação de angiogênese e aquisição de propriedades de células tronco-tumorais (CSC) (Kalluri e Weinberg, 2009; Polyak e Weinberg, 2009; van der Pluijm, 2011).

Alterações no microambiente tumoral também fazem parte da EMT. Em tumores metastáticos ocorre um aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), o que confere a esses casos mais avançados um pior prognóstico. Mais especificamente, MMP-9 é uma importante endopeptidase dependente de zinco, capaz de degradar componentes da membrana basal / lâmina própria. Sendo assim, o aumento da expressão de MMP-9 está relacionada com metástase tumoral, facilitando a disseminação/migração de diversos tumores, incluindo câncer de bexiga. (McConkey e cols., 2010; Weinstein e cols., 2014; Ao e cols., 2014; Guo e cols., 2012; Li e cols., 2012; Ahmad e cols., 2014; Yang e cols., 2014; Wang e cols., 2015; Song e cols., 2015)

A EMT não é um evento específico que ocorre somente no desenvolvimento do câncer. Ele é dividido em 3 subtipos: a) Tipo I – relacionado ao desenvolvimento embrionário; b) Tipo II – relacionado ao processo de cicatrização tecidual; c) Tipo III – relacionado à origem e desenvolvimento de neoplasias (Savagner e cols., 1994; Thiery, 2002; Yao e cols., 2011; Tan e cols., 2014)(Figura 3).

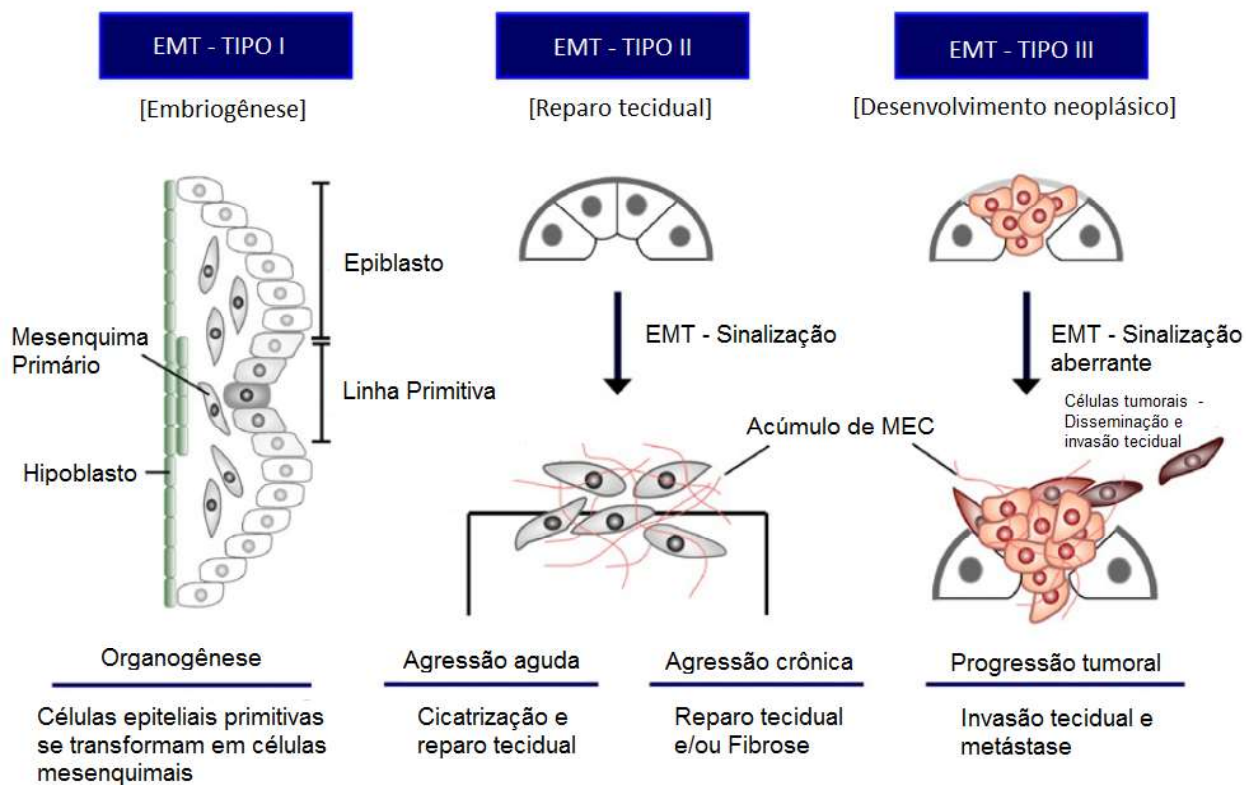


Figura 3 – Classificação dos tipos de Transição-Epitélio-Mesenquimal. Adaptado de: Lee e Nelson (2012)

Os marcadores imunoistoquímicos clássicos relacionados à EMT podem ser agrupados em duas categorias, os marcadores epiteliais e mesenquimais. Em nosso estudo analisamos E-cadherina (ECAD) e B-catenina (BCAT) como marcadores epiteliais e vimentina (VIM) e N-cadherina (NCAD) como marcadores mesenquimais (Figura 4).

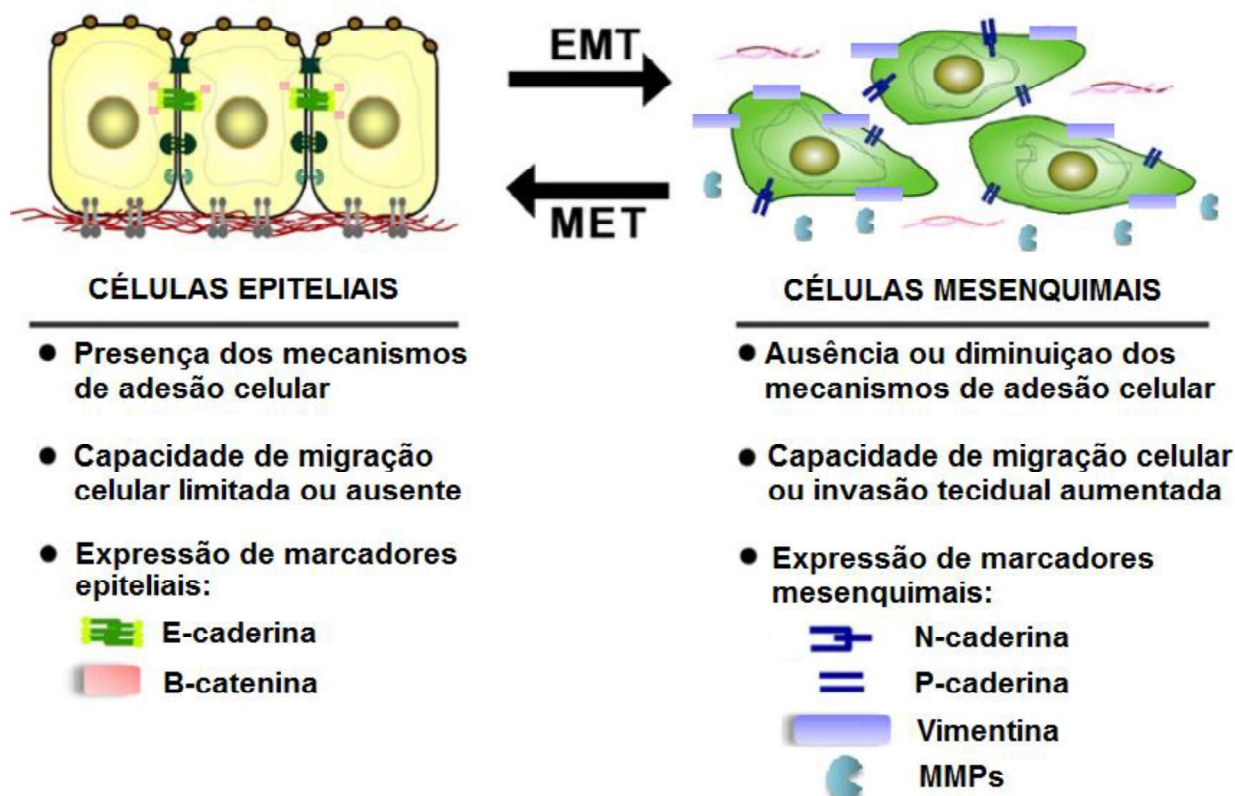


Figura 4 – Demonstração da dinâmica reversível do processo EMT – MET; alteração do fenótipo epitelial para mesenquimal. Adaptado de: Lee e Nelson (2012).

2.2. TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL E *STEMNESS*

Alguns estudos sugerem que a maioria dos processos de metástase e invasão tumorais estão relacionados com processo de EMT e a geração de *cancer stem-like cells* (Mani e cols., 2008; Santisteban e cols., 2009; Kasper e cols., 2009; Gupta e cols., 2009; van der Horst e cols., 2012).

É atribuído à *stemness*, nas células-tronco tumorais (CSC), a capacidade proliferativa e um menor padrão de diferenciação celular. Nas células tumorais diferenciadas a habilidade de auto-renovação e formação de metástases à distância é atribuída à influência da EMT (Qiao e cols., 2012). Previamente foi demonstrado por Spaderna e cols., 2007 a expressão de genes associados tanto

ao processo da EMT e “stemness” no fronte de invasão tumoral de tumores colorretais no processo de progressão tumoral (Islam e cols., 2015) (Figura 5).

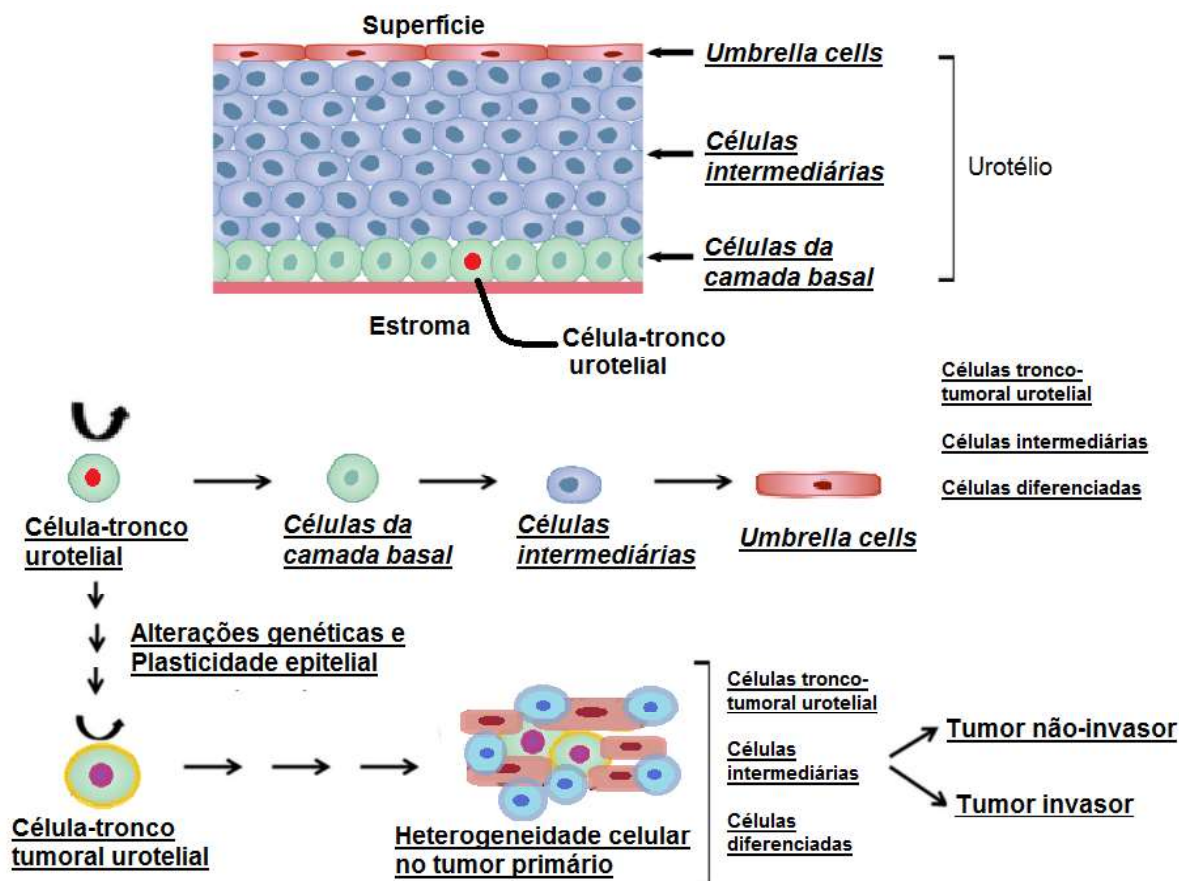


Figura 5 – Desenvolvimento e progressão tumoral a partir das células tronco uroteliais. Adaptado de: Garg (2015).

2.3. STEMNESS

Heterogeneidade intra-tumoral (ITH) é um conceito que explica a existência de diferentes subpopulações de células com diferentes funções na iniciação e progressão tumoral, sendo atribuídas essas características a células-tronco tumorais (CSC) e *stemness* (Reya e cols., 2001).

É atribuída à ITH as diferentes formas de evolução/progressão da doença, considerando os padrões de recorrência e progressão tumorais. Por isso, faz-se

importante a construção e validação de painéis imunohistoquímicos objetivando a melhor indicação terapêutica para cada paciente.

Atualmente, CSC e *stemness* têm sido estudados em vários tumores, incluindo câncer de bexiga. É chamada de CSC uma subpopulação de células tumorais com capacidade de iniciação tumoral, proliferação, auto-renovação, progressão da doença e metástase. Estas características são conhecidas como propriedades das células tronco-tumorais (*stemness*), que podem ser consideradas intrínsecas, podendo ser influenciadas, ou não, pelo microambiente local (Reya e cols., 2001; Garg e cols., 2015).

É atribuído à *stemness* das células tumorais capacidade proliferativa e um padrão de menor diferenciação celular. Em contrapartida, células tumorais diferenciadas, influenciadas pela EMT adquirem habilidade de auto-renovação, facilitando a migração e neo-formação tumoral (Mani e cols., 2008).

2.4. TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL E CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Estudos prévios sugerem que a EMT também apresenta importante papel no desenvolvimento, progressão e desdiferenciação das células tumorais em células-tronco tumorais (Mani e cols., 2008; Kasper, 2009; Santisteban e cols., 2009; Grupta e cols., 2009; Brandt e cols., 2009; Rosen e Jordan, 2009; Hanahan e Weinberg, 2011; Islam e cols., 2015).

Foi também proposto, que ambos tipos de CSC expressam características similares como proliferação assimétrica e resistência a quimioterápicos. Entretanto, somente CSC migratórias seriam capazes de disseminar e metastatizar. A plasticidade epitelial, influenciada pela EMT, é responsável por

uma troca dinâmica entre os dois diferentes fenótipos que as CSC podem apresentar (estacionário e migratório). É atribuído às CSC migratórias um fenótipo invasivo que propicia a sua disseminação pela circulação sanguínea, extravasamento para o meio extra-vascular e colonização de órgãos alvos, promovendo metástases (Soltanian e Matin, 2011; Garg, 2015).

Este fenômeno está relacionado à alteração da homeostase do microambiente local, durante EMT, que promove alteração na MEC / estroma, deixando o ambiente mais permissivo, por meio de alteração de mecanismos de sinalização (ex.: VEGF, EGF, TGF- β , MMPs, células inflamatórias, endoteliais e fibroblastos) (Kenny e cols., 2007).

2.5. MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

Diversos marcadores de superfície, como CD44, CD24 e CD47, são estudados em vários tipos de tumores, incluindo câncer de bexiga, com o propósito de identificar CSC/TIC (células de iniciação tumoral), e a sua assinatura genética. De acordo com o padrão de sua expressão, poderia ser identificado em quais casos a doença tem uma predisposição a recorrência tumoral ou progressão (não-invasora para invasora) (Chan e cols., 2009).

CD47 é uma proteína transmembrana que inibe o processo de fagocitose mediado por macrófagos. A expressão de CD47 é observada em uma variedade de células tumorais, principalmente em TIC, em que expressão CD47⁺ indica pior prognóstico em pacientes com câncer. Sendo assim, terapia anti-CD47, pode ser considerado um tratamento promissor por meio do aumento da fagocitose das células tumorais por macrófagos (Majeti e cols., 2009; Jaiswal e cols., 2009; Barclay e Van den Berg, 2014; Liu e cols., 2015).

Estudos prévios demonstraram que a presença de células tumorais com imunorreatividade positiva para CD44 (CD44+), em CAUB, são mais tumorigênicas que as células com imunorreatividade negativa para CD44 (CD44-). Tumores gerados a partir de células CD44+ são compostos tanto por células bem/moderadamente diferenciadas e células pouco diferenciadas. Entretanto, células tumorais pouco diferenciadas e CD44- não são capazes de produzir tumores secundários (Chan e cols., 2009; Syed e cols., 2016).

Expressão de subtipos de CD44, como CD44v6, é mais frequente em tumores não-invasores (Ta e Tis), quando comparados a tumores invasores (T1 – T4)(Klatte e cols., 2010).

Embora CD24 seja conhecido como marcador de CSC em diversos tumores, como câncer de mama, pâncreas, ovário e fígado, alguns estudos sugerem que a expressão de CD24+ pode ser usada como preditor de progressão tumoral em CAUB (Al-Hajj e cols., 2003; Smith e cols., 2006; Li e cols., 2007; Gao e cols., 2010; Lee e cols., 2011).

Estudos prévios analisaram expressão de CD24, CD44 e CD47 em CAUB. Apesar de não ter sido demonstrado correlação entre a expressão de CD24 e CD44+/CD47+ (Hofner e cols., 2014), expressão positiva de CD47 é significativamente aumentada em células de iniciação tumoral CD44+ que em CD44- (Chan e cols., 2009).

Foi reportado previamente que CD44+ e CD24+ podem ser utilizados para a identificação CSC/TIC em CAUB. A expressão positiva para estas proteínas está presente em dois tipos distintos de subpopulações celulares em câncer de bexiga (Hofner e cols., 2014). A avaliação da intensidade da expressão dos marcadores CD24 e CD44 demonstrou uma maior especificidade para CD24

para a identificação de células tumorais em CAUB quando comparada à expressão de CD44. Quando analisados em células de CAUB versus células MEC / estroma demonstraram que CD24 é expresso exclusivamente em células de CAUB, enquanto os componentes de estroma foram negativos ou foram expressos em baixa intensidade. Em contraste, a expressão de CD44 foi evidenciada tanto nas células de CAUB quanto nos componentes do estroma / MEC (Overdevest e cols., 2011; Hofner e cols., 2014).

Embora a expressão CD24+ e CD44+ esteja associada a uma redução de sobrevida em CAUB, quando combinados com outros parâmetros como graduação e estadiamento tumorais, a expressão tanto de CD24 quanto de CD44 não se demonstraram como preditores independentes em pacientes que foram submetidos a cistectomia radical (Hofner e cols., 2014).

3. INTRODUÇÃO A CADERINAS

Caderinas são glicoproteínas transmembrana envolvidas no Sistema de adesão inter-celular em tecidos epiteliais (Takeichi, 1995; Cavallaro e cols., 2002).

E-caderina (ECAD), N-caderina (NCAD) e P-caderina (PCAD) são conhecidas como caderinas clássicas, envolvidas no processo da EMT. *Cadherin Switch* (CS) é uma das principais etapas relacionadas a EMT, que é caracterizada pela perda/anormal expressão de ECAD e ganho/nova expressão de NCAD e PCAD, marcadores epiteliais e mesenquimais respectivamente. Este fenômeno propicia a progressão para CAUB de natureza musculo-invasora e metastática (Cavallaro e cols., 2002; Lascombe e cols., 2006; Bryan e cols.,

2008; Wheelock e cols., 2008; Acloque e cols., 2009; Thiery e cols., 2009; Zeisberg e Neilson, 2009; Bryan e Tselepis, 2010; Usui e cols., 2014).

3.1. N-CADERINA

Normalmente a NCAD é expressa por tecidos de natureza neural, endotelial, muscular, mas não por células epiteliais (Wheelock e cols., 1991; Nollet e cols., 2000; Rieger-Christ e cols., 2001; Bryan e Tselepis, 2010; Bryan, 2015).

A presença de expressão positiva de NCAD, é considerada um evento novo, estando associada a tumores com fenótipo mesenquimal/invasor incluindo CAUB (Hazan e cols., 1997; Giroldi e cols., 1999).

Durante o processo de EMT, ocorre a redução da ECAD associada a um ganho/nova expressão de PCAD e NCAD, induzindo processo de invasão e metástase. A expressão de NCAD tem sido relacionada ao aumento de metaloproteinases (ex.: MMP-9) que tem como função a degradar componentes da matriz extracelular, promovendo alterações microambientais / locais que contribuem para a invasão tumoral (Suyama e cols., 2002).

Estes eventos podem ocorrer de maneira sincrônica ou independente. Foi previamente descrita uma redução ou completa ausência da expressão de ECAD em mais de 80% dos casos de tumores uroteliais de bexiga musculo-invasores e expressão positiva de NCAD em mais de 60% dos casos de mesma natureza (Bryan e Tselepis, 2010). (Figura 6)

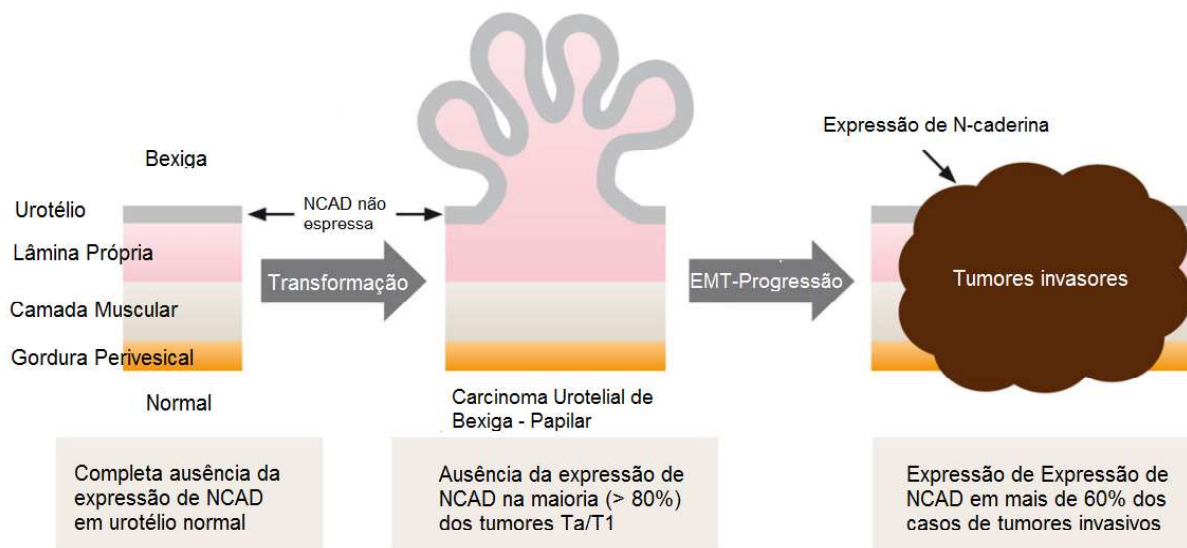


Figura 6 – Demonstração da expressão de NCAD durante processo de desenvolvimento tumoral. Adaptado de: Bryan e Tselepis (2010).

Esse achado é confirmado em outros estudos que demonstraram um aumento da expressão de NCAD em tumores de alto-grau com estadiamento avançado (Rieger-Christe cols., 2001; Lascombe e cols., 2006; Bryan e cols., 2008; Mandeville e cols., 2008; Wang e cols., 2014; Bryan, 2015).

3.2 VIMENTINA

Células submetidas ao processo EMT, frequentemente expressam diminuição de expressão/perda de ECAD, associado ao aumento da expressão de marcadores mesenquimais (ex.: VIM e NCAD) (Moreno-Bueno e cols., 2009; Xie e cols., 2010; Gasparotto e cols., 2011; Markiewicz e cols., 2012).

A vimentina (VIM) é uma proteína de filamento intermediário com expressão positiva em tumores uroteliais, também relacionada ao processo EMT. Foi sugerido previamente que a expressão positiva de Vimentina e expressão anormal de ECAD e BCAT, estaria relacionada a tumores de bexiga com: a) alto-grau, b) estadiamento avançado, c) padrão de recorrência tumoral,

d) metástase. Foi descrito também que a VIM é principalmente expressa em tumores invasores (MIBC) quando comparado a tumores superficiais (NMIBC) (Baumgart e cols., 2007; Mendez e cols., 2010; Paliwal e cols., 2012; Yun e Kim, 2013).

Quando analisados pacientes com CAUB (T2) com expressão positiva de VIM e Twist, associada a uma menor expressão de ECAD, apresentaram uma maior recorrência tumoral, progressão da doença e morte, quando comparados àqueles com expressão negativa para esses marcadores (VIM e Twist). (Khorrami e cols., 2012; Zhao e cols., 2014).

Apesar de ocorrer aumento/ganho de expressão de NCAD e VIM em doenças avançadas, nem sempre é encontrada associação entre a expressão de VIM e NCAD em CAUB (Baumgart e cols., 2007).

3.3. E-CADERINA

A ECAD é uma molécula de adesão expressa por células epiteliais, que apresenta-se conectada a proteínas do citoesqueleto por meio de proteínas intermediárias, cateninas (alfa, beta e gama), com objetivo de preservar a conformação estrutural do tecido epitelial. Redução da expressão de ECAD induz à perda de diferenciação e alteração da polaridade celular, aumento da motilidade e capacidade de invasão tecidual, agressividade tumoral, tumores de alto-grau e estadiamento avançados nos casos de CAUB (Bringuier e cols., 1993; Grunwald, 1993; Takeich, 1993; Rebel e cols., 1994; Behrens, 1994; Bryan e Tselepsi, 2010).

Foi relatado previamente que em CAUB de alto-grau e natureza musculo-invasora ocorre um predomínio da expressão anormal de ECAD com diminuição

da expressão ou completa ausência de imunorreatividade em cerca de 80% dos casos (Chaffer e cols., 2006; Baumgart e cols., 2007; McConkey e cols., 2009; Bryan e Tselepis, 2010; Kenney e cols., 2011). (Figura 7)

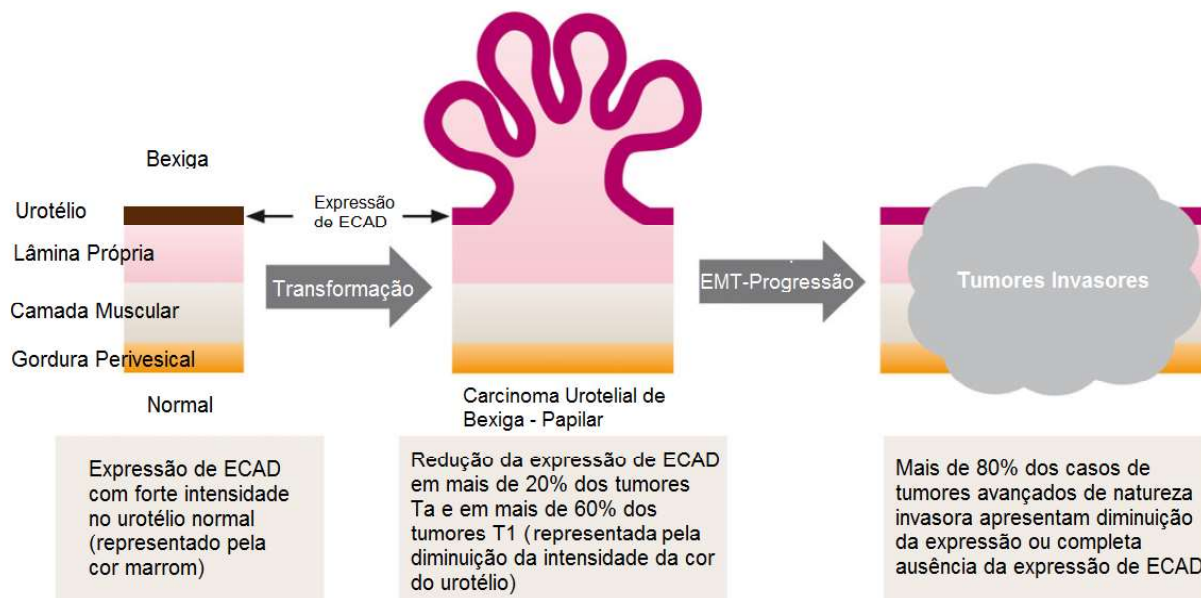


Figura 7 – Demonstração da perda de expressão de ECAD durante processo de desenvolvimento tumoral. Adaptado de: Bryan e Tselepis (2010).

Após alteração da expressão da ECAD ocorrem alterações no citoesqueleto da células que permitem às células adquirirem um fenótipo mesenquimal e conseqüentemente um aumento da motilidade celular e da capacidade de invasão tecidual (Moreno-Bueno e cols., 2009; Xie e cols., 2010; Markiewicz e cols., 2012).

A perda da expressão de ECAD em membrana celular associada a expressão nuclear tem sido relatada em vários tumores, incluindo tumores uroteliais (Byrne e cols., 2001; Chetty e cols., 2008; Salahshor e cols., 2008; Elston e cols., 2009).

3.4. E-CADERINA NUCLEAR

Acúmulo nuclear de ECAD é reportado com fator prognóstico independente, indicando uma redução de sobrevida global em pacientes com carcinoma de bexiga com diferenciação plasmocitóide, que foram submetidos a cistectomia radical com quimioterapia adjuvante. Estes achados podem explicar o comportamento mais agressivo de tumores uroteliais com suas variações (ex.: diferenciação plasmocitóide); assim como descrito previamente em tumor de esôfago – carcinoma de células escamosas; tumor endócrino de pâncreas e adenoma hipofisário) (Salahshor e cols., 2008; Chetty e cols., 2008; Fougner e cols., 2010; Keck e cols., 2012).

Os mecanismos moleculares que levam ao acúmulo nuclear de ECAD ainda não foram elucidados por completo. Entretanto, considera-se, como em outros tumores, que a migração e concentração nuclear de ECAD está relacionada com uma combinação da migração de BCAT / ECAD para o núcleo, ainda que previamente tenha sido demonstrado que o acúmulo de BCAT nuclear seja independente do acúmulo ECAD nuclear (ex.: tumores sólidos pseudopapilares de pâncreas) (El-Bahrawy e cols., 2008).

Diversos estudos que analisaram o papel da expressão de ECAD e BCAT em câncer de bexiga demonstraram que a expressão aberrante destes marcadores foi associada com a progressão tumoral e com pior prognóstico. Entretanto, esses resultados ainda apresentam controvérsias (Bringuier e cols., 1993; Shimazui e cols., 1996; Syrigos e cols., 1998; Mialhe e cols., 1997; Garcia del Muro e cols., 2000; Koksai e cols., 2006; Kashibuchi e cols., 2007).

3.5. B-CATENINA

A BCAT é uma das proteínas de ancoragem que conectada à ECAD promove manutenção da estabilidade estrutural e manutenção da forma dos componentes do urotélio, sendo parte dos mecanismos de adesão inter-celular (Peinado e cols., 2007).

Considerando a relação entre a expressão de BCAT e ECAD, foi sugerido previamente que a expressão reduzida desses marcadores está relacionado com graduação e estadiamento tumoral (Bringuier e cols., 1993; Syrigos e cols., 1998; Shimazui e cols., 1996; Garcia del Muro e cols., 2000).

A diminuição da expressão de ECAD está associada à ruptura das ligações com as proteínas de ancoragem, nesse caso a BCAT. Uma vez liberada, ocorre a sua migração para o citoplasma, onde será degradada pelo complexo APC (Adenomatose polipose coli) ou será transportada/migrará até o núcleo, para então atuar como fator de transcrição. Essa ativação anormal da via de sinalização WNT/BCAT contribui para a tumorigênese do CAUB, induzindo proliferação celular, EMT, crescimento de característica invasiva e metástase (Clairotte e cols., 2006; Brembeck e cols., 2006; Ahmad e cols., 2011; van der Horst e cols., 2012).

Embora tenha sido demonstrado por Garcia del Muro e cols. (2000), previamente que a perda sincrônica de ECAD e BCAT indicaram pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes com CAUB nos diversos estadiamentos da doença, esse resultado não foi confirmado em outros trabalhos. Foi demonstrado que BCAT manteve-se expressa independentemente do estadiamento tumoral, demonstrando um papel importante estruturalmente em tecido epitelial na bexiga

(Clairotte e cols., 2006). Isso demonstra a multifuncionalidade da BCAT, pois, além de sua função nos mecanismos de adesão, ela também apresenta papel importante nas vias de transdução como fator de transcrição, sendo considerada nos processos de proliferação e invasão tecidual e metástases (Resnik, 1997; Mann e cols., 1999).

Embora estudos prévios tenham demonstrado que a expressão nuclear de BCAT ocorra em até 22% dos casos (Zhu e cols., 2000; Shiina e cols., 2002; Stoehr e cols., 2002; Urakami e cols., 2006), outros estudos não mencionaram a expressão nuclear de BCAT em seus achados (Shimazui e cols., 1996; Garcia del Muro e cols., 2000; Bryan e cols., 2008). Apesar disso, foi previamente descrito que a presença nuclear de BCAT está associada a graduação, estadiamento tumoral e pior prognóstico em casos de câncer de bexiga (Jang e cols., 2010; Jing e cols., 2014).

Na presente dissertação foram avaliados marcadores clássicos relacionados ao processo de EMT buscando avaliar a sua influência nos casos de carcinoma urotelial de bexiga de alto-grau musculo-invasores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*. 2009; 119:1438–49.
- Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and re- verses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:5060–72.
- Ahmad I, Morton JP, Singh LB, Radulescu SM, Ridgway RA, Patel S, et al. Beta-Catenin activation synergizes with PTEN loss to cause bladder cancer formation. *Oncogene*. 2011;30(2):178–89.
- Ahmad R, Shihab PK, Jasem S, Behbehani K. FSL-1 induces MMP-9 production through TLR-2 and NF-kappaB/AP-1 signaling pathways in monocytic THP-1 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 34:929–42.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:3983–8.
- Ao N, Liu Y, Feng H, Bian X, Li Z, Gu B, et al. Ubiquitin-specific peptidase USP22 negatively regulates the STAT signaling pathway by deubiquitinating SIRT1. *Cell Physiol Biochem*. 2014; 33:1863– 75.
- Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32:25-50.
- Baumgart E, Cohen MS, Silva Neto B, Jacobs MA, Wotkowicz C, Rieger-Christ KM, et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition ex- pression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 1685–94.
- Behrens J. Cell contacts, differentiation and invasiveness of epithelial cells. *Invasion Metastasis*. 1994; 14:61-70.
- Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, He X, Ling S, Schaeffer EM, et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28: 291–304.
- Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 2006; 16:51–59.
- Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res*. 1993;53(14):3241-3245.

Bryan RT, Atherfold PA, Yeo Y, Jones LJ, Harrison RF, Wallace DM, et al. Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies. *J. Pathol.* 2008; 215:184–194.

Bryan RT, Tselepis C. Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol.* 2010;184 423–431.

Bryan RT. Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena. *Phil Trans R Soc B.* 2015;370: 20140042.

Byrne RR, Shariat SF, Brown R, Kattan MW, Morton RJ, Wheeler TM, et al. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term followup. *J Urol.* 2001; 165:1473–1479.

Cao D, Vollmer RT, Luly J, Jain S, Roytman TM, Ferris CW, et al. Comparison of 2004 and 1973 World Health Organization grading systems and their relationship to pathologic staging for predicting long-term prognosis in patients with urothelial carcinoma. *Urology.* 2010 set;76(3):593-9.

Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett.* 2002; 176:123–128.

Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 2006; 66:11271-8.

Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:14016–21.

Cheng L, Maclennan GT, Lopez-Beltran A. Histologic grading of urothelial carcinoma: a reappraisal. *Hum Pathol.* 2012; 43(12):2097-108.

Chetty R, Serra S, Asa SL. Loss of membrane localization and aberrant nuclear E-cadherin expression correlates with invasion in pancreatic endocrine tumors. *Am J Surg Pathol.* 2008, 32:413–419.

Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol.* 2006 Jul;174(1):107-10.

Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, Mauny F, Félix S, Algros MP, et al. Expression of E-cadherin and a-, h-, g- catenins in patients with bladder cancer: identification of g-catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T1 superficial urothelial tumors. *AmJ Clin Pathol.* 2006; 125:119-26.

Dinney CP, Mcconkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bareli M, Adam L, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell*. 2004; 6:111–116.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti III A. *AJCC cancer staging manual*, 7th ed. New York: Springer; 2010.

El-Bahrawy MA, Rowan A, Horncastle D, Tomlinson I, Theis BA, Russel RC, et al. E-cadherin/catenin complex status in solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32:1–7.

Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Cook RJ, Little NS, et al. Nuclear accumulation of e-cadherin correlates with loss of cytoplasmic membrane staining and invasion in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:1436–1442.

Fougner SL, Lekva T, Borota OC, Hald JK, Bollerslev J, Berg JP. The expression of E-cadherin in somatotroph pituitary adenomas is related to tumor size, invasiveness, and somatostatin analog response. *J Clin Oncol Metab*. 2010; 95:2334–42.

Freedman ND, Silverman DT, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Abnet CC. Association between smoking and risk of bladder cancer among men and women. *JAMA*. 2011 Aug;306(7):737-45.

Gao MQ, Choi YP, Kang S, Youn JH, Cho NH. CD24⁺ cells from hierarchically organized ovarian cancer are enriched in cancer stem cells. *Oncogene*. 2010; 29:2672–80.

Garcia del Muro X, Torregrosa A, Muñoz J, Castellsagué X, Condom E, Vigués F, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and b-catenin in bladder cancer. *Eur. J. Cancer*. 2000; 36: 357–62.

Garg M. Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity: current concepts and therapeutic implications in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2015:691–701.

Gasparotto D, Polesel J, Marzotto A, Colladel R, Piccinin S, Modena P, et al.: Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2011; 2: 1165-75.

Giroldi LA, Bringuier PP, Shimazui T, Jansen K, Schalken JA. Changes in cadherin-catenin complexes in the progression of human bladder carcinoma. *Int J Cancer*. 1999; 82:70-76.

Grunwald GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 1993; 5:797–805.

Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology (EAU); 2015. p. 10.

Guo C, Hou GQ, Li XD, Xia X, Liu DX, Huang DY, et al. Quercetin triggers apoptosis of lipopolysaccharide (LPS)-induced osteoclasts and inhibits bone resorption in RAW264.7 cells. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 30:123–36.

Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med*. 2009; 15:1010–2.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144:646–674.

Harada K, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int*. 2012;110:E1131–7.

Hazan RB, Kang L, Whooley BP, Borgen PI. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun*. 1997; 4:399-411.

Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Haferman MD, et al. Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J Urol*. 1983; 130:1083–6.

Hofner T, Macher-Goeppinger S, Klein C, Schillert A, Eisen C, Wagner S, et al. Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urol Oncol*. 2014; 32:678–86.

Hu H, Wang YL, Wang GW, Wong YC, Wang XF, Wang Y, et al. A novel role of Id-1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer. *Urol Oncol*. 2013; 31:1242–53.

Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J, et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut*. 2013; 62: 1315-26.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. [visited in oct, 2016]. Disponível em : <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>

Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam AKY. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and Molecular Pathology*. 2015; 98(2):184–191.

Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell*. 2009; 138:271–285.

Jang TJ, Cha WH, Lee KS. Reciprocal correlation between the expression of cyclooxygenase-2 and E-cadherin in human bladder transitional cell carcinomas. *Virchows Arch*. 2010; 457:319–28.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59:225-249.

Jiang F, Ma S, Xue Y, Hou J, Zhang Y. LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 469:985–92.

Jing Y, Cui D, Guo W, Jiang J, Jiang B, Lu Y, et al. Activated androgen receptor promotes bladder cancer metastasis via Slug mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Lett*. 2014; 348:135–45.

Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011; 13: R59.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009; 119:1420-8.

Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA, Kume H, Takeuchi T, Kitamura T. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin in bladder cancer patients who underwent radical cystectomy. *Int J Urol*. 2007; 14:789–94.

Kasper S. Identification, characterization, and biological relevance of prostate cancer stem cells from clinical specimens. *Urol Oncol*. 2009; 27:301–3.

Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet* 2009; 374:239–49.

Keck B, Wach S, Kunath F, Bertz S, Taubert H, Lehmann J, et al. Nuclear E-cadherin Expression is Associated with the Loss of Membranous E-cadherin, Plasmacytoid Differentiation and Reduced Overall Survival in Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Ann Surg Oncol*. 2012; 20:2440–5.

Kenney PA, Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Neto BS, Gould JJ, Harty NJ, et al. Novel ZEB1 expression in bladder tumorigenesis. *BJU Int*. 2011; 107:656-63.

Kenny PA, Lee GY, Bissell MJ. Targeting the tumor microenvironment. *Front Biosci*. 2007; 12:3468–3474.

Khorrani MH, Hadi M, Gharaati MR, Izadpanahi MH, Javid A, Zargham M. E-cadherin expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the bladder after transurethral resection. *Urol J*. 2012; 9: 581-5.

Klatte T, Seligson DB, Rao JY, Yu H, de Martino M, Garraway I, et al. Absent CD44v6 expression is an independent predictor of poor urothelial bladder cancer outcome. *J Urol*. 2010; 183:2403–2408.

Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Publ Gr [Internet]*. Nature Publishing Group. 2015;15(1):25–41.

Koksal IT, Ates M, Danisman A, Sezer C, Ciftcioglu A, Karpuzoglu G, et al. Reduced E-cadherin and α -catenin expressions have no prognostic role in bladder carcinoma. *Pathol. Oncol. Res*. 2006; 12: 13–19.

Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin. Cancer Res*. 2006;12(9): 2780–2787.

Lee TK, Castilho A, Cheung VC, Tang KH, Ma S, Ng IO. CD24(b) liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. *Cell Stem Cell*. 2011; 9:50–63.

Lee K, Nelson CM. *New Insights into the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis*. 1st ed. International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier Inc. 2012; p. 171-221.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007; 67:1030–7.

Li Q, Li M, Wang YL, Fauzee NJ, Yang Y, Pan J, et al. RNA interference of PARG could inhibit the metastatic potency of colon carcinoma cells via PI3-kinase/AKT pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 29:361–72.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001; 411:375–9.

Liu B, Miyake H, Nishikawa M, Fujisawa M. Expression profile of epithelial-mesenchymal transition markers in non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: Correlation with intravesical recurrence following transurethral resection. *Urol Oncol*. 2015; 33(3):110.e11-8.

Liu X, Pu Y, Cron K, Deng L, Kline J, Frazier WA, et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med* 2015; 21:1209–15.

Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jr KDG, Rooijen N Van, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 2009; 138:286–299.

Mandeville JA, Neto BS, Vanni AJ, Smith GL, Rieger-christ KM, Zeheb R, et al. P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *BJU Int.* 2008; 102:1707–1714.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The Epithelial-Mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008; 133:704-715.

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, et al. Target genes of beta- catenin–T cell–factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:1603-1608.

Markiewicz A, Ahrends T, Wełnicka-Jaśkiewicz M, Seroczyńska B, Skokowski J, Jaśkiewicz J, et al.: Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer. *J Transl Med.* 2012; 10: 226.

McConkey DJ, Choi W, Marquis L, Martin F, Williams MB, Shah J, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28(3–4):335–44.

McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2010; 28(4):429–40.

Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 2010; 24:1838-51.

Mialhe A, Louis J, Monteleiver S, Peoch M, Pasquier D, Bosson JL, et al. Expression of E-cadherin and a-, b- and g-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invasion Metastasis.* 1997; 17: 124–37.

Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodriguez J. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol.* 2000; 164:680–4.

Miyamoto, H., Miller, JS., Fajardo, DA., Lee, TK., Netto, GJ, Epstein, JI. Non-invasive papillary urothelial neoplasms: The 2004 WHO/ISUP classification system. *Pathology International* (2010), (Table 1), 1–8.

Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol.* 2005; 13(2):143–53.

Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, et al. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc.* 2009; 4(11): 1591-613.

Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H. Histological typing of urinary bladder tumours. Vol. 10. Geneva: World Health Organization; 1973. International Histological Classification of Tumors.

Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, Garcı R, Serra C, Carrato A, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Aug;16(8):1595-600.

NCI - National Cancer Institute [webpage]. [visited in oct, 2016]. Available in: (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html#>).

Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J: Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother Oncol.* 2011; 99: 344-8.

Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J. Mol. Biol.* 2000; 299:551–572.

Nozato M, Kaneko S, Nakagawara A, Komuro H. Epithelial- mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. *Int J Oncol.* 2013; 42: 134-40.

Olivo M, Lucky SS, Kent Mancer JF, Lau WK. Altered expression of cell adhesion molecules leads to differential uptake of hypericin in urothelial cancer. *Urol Oncol.* 2012;30:624–34.

Orlichenko LS, Radisky DC. Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clin Exp Metastasis.* 2008; 25:593–600.

Overdevest JB, Thomas S, Kristiansen G, Hansel DE, Smith SC, Theodorescu D. CD24 offers a therapeutic target for control of bladder cancer metastasis based on a requirement for lung colonization. *Cancer Res.* 2011; 71:3802–11.

Paliwal P, Arora D, Mishra AK. Epithelial mesenchymal transition in urothelial carcinoma: twist in the tale. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012; 55:443-9.

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

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:415-28.

Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 2006; 3(6):327-40.

Pierzynski JA, Hildebrandt MA, Kamat AM, Lin J, Ye Y, Dinney CPN, et al. Genetic Variants within the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as Indicators of Bladder Cancer Risk. *J Urol*. 2015; 194:1771–6.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:265–73.

Qiao B, Gopalan V, Chen Z, Smith RA, Tao Q, Lam AK. Epithelial–mesenchymal transition and mesenchymal–epithelial transition are essential for the acquisition of stem cell properties in hTERT-immortalised oral epithelial cells. *Biol. Cell*. 2012; 104:476–489.

Rebel JM, Thijssen CD, Vermey M. E-cadherin expression determines the mode of replacement of normal urothelium by human bladder carcinoma cells. *Cancer Res*. 1994; 54:5488-5492.

Resnik E. Beta-catenin: one player, two games. *Nat Genet*. 1997; 16:9-11.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001; 414:105–11.

Rieger-Christ KM, Cain JW, Braasch JW, Dugan JM, Silverman ML, Bouyounes B, et al. Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. *Hum Pathol*. 2001; 32:18–23.

Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*. 2009; 324:1670–1673.

Roussos ET, Keckesova Z, Haley JD, Epstein DM, Weinberg RA, Condeelis JS. AACR special conference on epithelial-mesenchymal transition and cancer progression and treatment. *Cancer Res*. 2010; 70: 7360–4.

Salahshor S, Naidoo R, Serra S, Shih W, Tsao MS, Chetty R, et al. Frequent accumulation of nuclear E-cadherin and alterations in the Wnt signaling pathway in esophageal squamous cell carcinomas. *Mod Pathol*. 2008; 21:271–281.

Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, et al. Immune-induced epithelial-to-mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res*. 2009; 69:2887–95.

Savagner P, Boyer B, Valles AM, Jouanneau J, Thiery JP. Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Treat Res*. 1994 ;71:229-49.

Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Terashima M, Deguchi M, Yamanaka M, et al. Beta-catenin mutations correlate with over expression of C-myc and cyclin D1 Genes in bladder cancer. *J Urol.* 2002; 168(5):2220–6.

Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CF, Akaza H, Koiso K, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (α -, β -, γ -catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res.* 1996; 56:4154–4158.

Smith SC, Oxford G, Wu Z, Nitz MD, Conaway M, Frierson HF, et al. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res.* 2006; 66:1917–22.

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Manuais de Condutas. *Rev Soc Bras de Oncologia Clínica.* 2011; p.173-189. [ISSN 1806-6054].

Soloway MS, Bruck DS, Kim SS. Expectant management of small, recurrent, noninvasive papillary bladder tumors. *J Urol.* 2003; 170: 438–41.

Soltanian S, Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol.* 2011; 32:425–40.

Song H, Pan D, Sun W, Gu C, Zhang Y, Zhao P, et al. SiRNA directed against annexin II receptor inhibits angiogenesis via suppressing MMP2 and MMP9 expression. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 35:875–84.

Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, Jung A, Kirchner T, Brabletz T. Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions during cancer progression. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 2007; 91:21–28.

Stoehr R, Krieg RC, Knuechel R, Hofstaedter F, Pilarsky C, Zaak D, Schmitt R, Hartmann A. No evidence for involvement of beta-catenin and APC in urothelial carcinomas. *Int J Oncol.* 2002; 20:905–911.

Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell.* 2002; 2:301–314.

Syed IS, Pedram A, Farhat WA. Role of Sonic Hedgehog (Shh) Signaling in Bladder Cancer Stemness and Tumorigenesis. *Curr Urol Rep.* 2016; 17(2):11.

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; 160:1889–93.

Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1993; 5:806-811.

Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1995; 7:619–627.

Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY-J, et al. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med.* 2014; 6:1279-93.

Thiery JP, Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2:442–454.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139:871–90.

Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Tokizane T, Ogishima T, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/h-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res.* 2006;12(2):383-91.

Usui A, Ko SY, Barengo N, Naora H. P-cadherin promotes ovarian cancer dissemination through tumor cell aggregation and tumor-peritoneum interactions. *Mol Cancer Res.* 2014; 12:504–513.

van der Horst G, Bos L, van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2012;10:995-1009.

van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone.* 2011; 48:37–43.

van Rhijn BWG, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur. Urol.* 2009 set;56(3):430-42.

Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796:75–90.

Wallace DM, Bryan RT, Dunn JA, Begum G, Bathers S. Delay and survival in bladder cancer. *BJU Int.* 2002; 89: 868-878.

Wang P, Lin SL, Zhang LH, Li Z, Liu Q, Gao JX, et al. The prognostic value of P- cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2014; 40:255–259.

Wang R, Ke ZF, Wang F, Zhang WH, Wang YF, Li SH, et al. GOLPH3 overexpression is closely correlated with poor prognosis in human non-small cell lung cancer and mediates its metastasis through upregulating MMP-2 and MMP-9. *Cell Physiol Biochem.* 2015; 35:969–82.

Weinstein JN, Akbani R, Broom BM, Verhaak RG, McConkey D, Lerner S, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. The Cancer Genome Atlas Research Network. *Nature* 2014; 507:315–322.

Wheelock MJ, Knudsen KA. Cadherins and associated proteins. *In vivo*. 1991; 5:505–513.

Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J. Cell Sci.* 2008; 121:727–735.

Wu K, Zeng J, Zhou J, Fan J, Chen Y, Wang Z, et al. Slug contributes to cadherin switch and malignant progression in muscle-invasive bladder cancer development. *Urol Oncol.* 2013; 31:1751–60.

Wu K, Ning Z, Zeng, J, Fan J, Zhou J, Zhang T, et al. Silibinin inhibits β -catenin/ZEB1 signaling and suppresses bladder cancer metastasis via dual-blocking epithelial-mesenchymal transition and stemness. *Cellular Signalling.* 2013; 25(12):2625–2633.

Wu X, Hildebrandt MA, Chang DW. Genome-wide association studies of bladder cancer risk: a field synopsis of progress and potential applications. *Cancer Metastasis Rev.* 2009; 28: 269-80.

Wu XR. Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer.* 2005; 5:713–725.

Xie D, Gore C, Liu J, Pong RC, Mason R, Hao G, et al. Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:2485-90.

Xu J, Wang R, Xie ZH, Odero-Marah V, Pathak S, Multani A, et al. Prostate cancer metastasis: role of the host microenvironment in promoting epithelial to mesenchymal transition and increased bone and adrenal gland metastasis. *Prostate* 2006; 66:1664–73.

Yang CQ, Li W, Li SQ, Li J, Li YW, Kong SX, et al. MCP-1 stimulates MMP-9 expression via ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34:266–76.

Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2011; 9:1608–20.

Yun SJ, Kim WJ. Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol.* 2013; 54:645–50.

Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009; 119:1429–37.

Zhang K, Shi B, Chen J, Zhang D, Zhu Y, Zhou C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and promote bladder cancer growth in a rabbit model. *Urol Int.* 2010; 84:94–9.

Zhao J, Dong D, Sun L, Zhang G, Sun L. Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *Int Braz J Urol.* 2014; 40:179–89.

Zhu X, Kanai Y, Saito A, Kondo Y, Hirohashi S. Aberrant expression of h-catenin and mutation of exon 3 of the h-catenin gene in renal and urothelial carcinomas. *Pathol Int.* 2000; 50:945-952.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas E-caderina, B-catenina, vimentina, N-caderina e CD44 em pacientes com Carcinoma Urotelial de Bexiga de Alto-Grau Músculo-Invasor.

4.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão imunohistoquímica dos marcadores relacionados à EMT: E-caderina, B-catenina, Vimentina, N-caderina
2. Avaliar a expressão imunohistoquímica do marcador relacionado à *stemness e Cancer Stem Cell*: CD44
3. Correlacionar a expressão imunohistoquímica dos marcadores estudados com:
 - a. Tempo de sobrevida;
 - b. Estadiamento;
 - c. Associação entre os marcadores.

ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS

*Moacyr Christopher Garces Gamarra Salem,** Paulo Roberto Laste, *Adriana Vial Roehé

Evaluation of the Immunohistochemical Expression of E-cadherin, B-catenin, N-cadherin, Vimentin and CD44 in the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Process and Tumorigenesis in Patients with High Grade Bladder Urothelial Carcinoma

Introduction: Bladder cancer is second most common urological malignancy. It was estimated 76 960 new cases of bladder cancer and 16 390 deaths in United States in 2016. Some concepts such epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), stemness, Cancer Stem Cells (CSC) are currently used to explain tumoral characteristics and predict outcome such recurrence, progression, metastasis, chemotherapy resistance and death.

Objective: The objective of the present study was to evaluate the immunohistochemical expression of proteins related to epithelial-to-mesenchymal transition and stemness/CSC in high-grade muscle-invasive bladder cancer, relating them with age, sex and survival analysis.

Materials and Methods: Bladder tumor samples were obtained from 34 patients diagnosed with high-grade muscle invasive bladder cancer who underwent radical cystectomy, in the urology department of the Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, during the period between 2000 and 2004. The formalin-fixed paraffin embedded samples from the patients were recovered from the hospital records. Immunohistochemistry markers expression on tumor samples were evaluated semiquantitatively according intensity of reaction, and protein localization by a single pathologist using a conventional light microscope. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$

Results: ECAD was mainly expressed in an aberrant pattern, with predominance of strong and moderate intensity. The nuclear expression of ECAD was present in approximately 61.8% of the cases, associated with the aberrant expression / intensity of ECAD, as well as NCAD+. BCAT expression was positive in 29.4% of the cases, being associated with tumor staging (TNM). The NCAD + standard was associated with a 2-year survival time (log rank test, $P < 0.05$). No other associations were found between the expression of the Immunohistochemical markers and other study variables.

Conclusion: Despite agreement with the literature that there is an aberrant expression of the various markers during the EMT process, the immunoreactivity pattern varies according to its nature (epithelial vs mesenchymal). Aberrant expression of the various epithelial markers (ECAD and BCAT) together with the appearance of mesenchymal markers (VIM and NCAD) and the association of these events with survival time and tumor staging were presented. One of the limiting factors in this study is the limited sample size. Despite this, the differential of this study is based on a specific cancer population with advanced and

aggressive behavior associated to an extensive follow-up of these patients. Therefore, further investigations increasing the number of patients, creating a comparison patient's group and including more immunohistochemistry markers are needed to achieve more consistent results.

Key-words: Bladder Cancer, E-cadherin, B-catenin, N-cadherin, Vimentin, CD44, Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)

Author Information

* Department of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil

** Department of Urology, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, Brazil.

Corresponding author: Adriana Roehe, MD, PhD, Departamento de Patologia – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite, 245/ Sala 10 – Bairro Centro, Porto Alegre – RS – Brazil, CEP: 90050-170
Phone: 55-51-33038793 Fax: 55-51-33038810

(E-mail: aroehe@gmail.com, adrianar@ufcspa.edu.br)

Conflicts of Interest and Source of Funding: The authors declare no conflict of interest.

INTRODUCTION

Bladder cancer is second most common urological malignancy (1)(2). It was estimated 76,960 new cases of bladder cancer and 16,390 deaths in United States in 2016. The number of deaths expected in men/women per 100 000 persons is 7.7 / 2.2 (3.5:1 / 100 000), respectively, according to National Cancer Institute (NCI) cancer statistics (3).

Some concepts such epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), stemness, Cancer Stem Cells (CSC) are currently used to explain tumoral characteristics and predict outcome such recurrence, progression, metastasis, chemotherapy resistance and death (4)(5)(6)(7)(8)(9).

These events are part of a tumor response to a complex process based on local and distance signaling pathways and their influence on stroma and tumor cells, through which epithelial cancer cells turn into a less differentiated state, expressing surface stem cell markers and acquiring stem-cell properties. Although the specific mechanism remains unclear, it has been reported that, CSC with mesenchymal properties could differentiate into endothelial cells contributing to tumoral angiogenesis and tumor growth (10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18).

EMT promotes a loss of cell-cell adhesion mechanism conferring tumor cell plasticity, change of polarity, downregulation of epithelial markers expression, expression of mesenchymal markers and local signaling pathways in stroma (7)(8)(9).

The objective of the present study was to evaluate the immunohistochemical expression of proteins related to epithelial-to-mesenchymal

transition and stemness/CSC in high-grade muscle-invasive bladder cancer, relating them with age, sex and survival analysis.

MATERIAL AND METHODS

Case selection

Bladder tumor samples were obtained from 34 patients diagnosed with high-grade muscle invasive bladder cancer who underwent radical cystectomy, in the urology department of the Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre, during the period between 2000 and 2004. The formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples from the patients were recovered from the hospital records.

Diagnostic Criteria

The diagnoses were reviewed and confirmed by a single pathologist (A.V.R) according to the World Health Organization Classification (2004 – WHO grading) and tumor stage (TNM 2010).

Immunohistochemical Reactions

FFPE specimens were cut into 3µm sections, deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed in 30 min water bath with sodium citrate buffer (pH 6.0) for E-cadherin (G-10 by Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, US) and B-catenin (Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA, US); and, it was used TRIS/EDTA (pH 9.0) for CD44 (Clone VFF-7, Leica Biosystems, Newcastle, UK) and N-cadherin (Clone 6G11 by Dako®), but not with vimentin (clone V9 by Dakocytomation®, Carpinteria, CA, US). Endogenous peroxidases were blocked with 5% hydrogen peroxide in methanol. After that, the sections were incubated for 1 hour with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma®) in PBS

and then overnight at 4°C with the primary antibodies (vimentin 1/300, E-cadherin 1/100, B-catenin 1/200 and CD44 1/50). N-cadherin (1/100) was incubated for 2 hours at 37°C. Next, the HRP-labeled conjugated polymer (ADVANCE HRP kit, Dakocytomation®) was incubated for 40 min at room temperature. Negative controls were obtained through the same protocol described above, replacing the primary antibody by BSA. Diaminobenzidine (DAB) (0.06%) was utilized to demonstrate the immunoreactions. The slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted.

Immunohistochemical analyses:

Protein expression on tumor samples were evaluated by a single pathologist (A.V.R), using a conventional light microscope, Olympus CX 41. The staining was evaluated semiquantitatively according intensity of reaction, and protein localization - including cell membrane, cytoplasmic or nuclear expression.

E-cadherin:

- Intensity: a) Negative (-): (Complete absence of immunoreactivity); b) Weak (+); c) Moderate (++); d) Strong (+++)
- Nucleus: (positive or negative)
- Localization: a) Normal: Similar to expressed in normal bladder urothelium – membrane positive and positive or negative cytoplasm; b) Aberrant: Complete absence of immunoexpression, cytoplasm positive with cell membrane negative, and positive nucleus staining

B-catenin:

- Positive: B-catenin expression in tumor cells
- Negative: Complete absence of B-catenin expression in tumor cells.

Vimentin and N-Cadherin:

- Positive: any expression in the cytoplasm of tumor epithelial cells. The presence of either mesenchymal markers in bladder carcinoma cells represents a new event, conferring to the tumor an aggressive /invasive phenotype.

CD44:

- Positive: any expression in the cell membrane of tumor epithelial cells (>10% positive nuclear expression of tumor cells).

Statistical analysis

Data were presented as mean \pm SD or frequency and percentage. We performed associations between variables with the χ^2 tests (Pearson's, Fisher's exact or Linear-by-Linear Association). For comparing continuous variables, a Student t-test or an unequal variance t-test was used. For survival analysis time zero was defined at the time of pathological diagnosis. Cumulative survival probabilities were estimated using the Kaplan-Meier method; the differences in survival were evaluated with the log-rank test.

Statistical significance was accepted at $P < .05$. All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc).

Results

Baseline characteristics of the patients are shown in table 1. The E-cadherin were positive in 30/34 (88.2%), most of the positive cases have shown an aberrant expression with predominance of strong and moderate immunoreactivity. Nuclear E-cadherin positive expression was observed in 61.8% of cases and was associated to E-cadherin intensity/aberrant and N-cadherin positive immunoreactivity. The B-catenin positive expression was identified in 29.4% of cases, and was associated to E-cadherin intensity and Tumor Stage (TNM). Vimentin was associated to E-cadherin aberrant and E-cadherin intensity. The N-cadherin expression was associated to 2 years survival

– log rank test ($p < 0.05$) (Figure 2). There's no significant correlation between the immunohistochemistry markers and other variables like age, sex and mortality.

DISCUSSION

Regarding bladder cancer, approximately 70% of the cases is presented as low grade, superficial tumors that are confined to the mucosa (Tis, Ta) or to the *lamina propria* (T1). The remaining 30% of the cases are presented as muscle invasive tumors (T2, T4) (19) (20).

Although the non-muscle-invasive bladder cancer can be treated with a less aggressive approach, the recurrence rate ranges from 30% to 70%. About 30% of these patients will progress to muscle-invasive disease (T2 or higher) (21)(22)(23).

Previous reports suggest that EMT may also play an important role in cancer development, tumor cell dedifferentiation and disease progression. Thus, it is crucial to determine molecular mechanisms that influence in outcome, predicting the best patient's individualized treatment. (15)(16)(17)(24)(25)(26)(27)

Several molecules involved in EMT could be used as useful prognostic indicators in patients with various types of malignant tumors, including bladder cancer; e.g.: ECAD and BCAT (epithelial markers), NCAD and VIM (mesenchymal markers); CD44 (stemness).

E-CADHERIN

In this study ECAD expression was similar to previous reports. Our data showed a predominance of abnormal ECAD expression in 80% of the cases (28).

Regarding strength of immunoreactivity in patients with high-grade and invasive tumors, it was identified a predominance of strong and moderate immunoreactivity in 76% of patients (5)(28)(29)(30)(31).

Considering the ECAD expression, it was previously reported based on the difference between normal vs aberrant/heterogeneous immunoreactivity in invasive bladder cancer tumors, not evaluating the intensity of reaction on this cases. The ECAD expression was considered normal in 33% and 45% and aberrant in 67% and 54% of muscle-invasive bladder cancer patients (> pT2), which is in agreement with our data that presented a predominance of aberrant/abnormal expression. Despite this, intensity of reactivity couldn't be compared.

ECAD-NUCLEAR

Another important finding was a positive nuclear/aberrant ECAD expression in our data.

Nuclear E-cadherin accumulation was suggested as an independent prognostic factor indicating a reduced overall survival (OS) in patients treated with cystectomy and adjuvant chemotherapy in an aggressive variant of urothelial bladder cancer (32).

In our study ECAD nuclear expression was present in 62% of all cases, and it was associated with ECAD intensity ($p < 0.001$), ECAD localization (aberrant immunoreactivity) ($p < 0.003$) and NCAD ($p < 0.05$). Patients NCAD+ presented ECAD nuclear positive in 83% of cases. Despite this, when we analyzed together patients with ECAD nuclear and NCAD positive reactions, there was no influence in patient's survival rates.

It was suggested that ECAD nuclear accumulation occurs by means of ECAD/BCAT (complex) shuttling to the nucleus, although it was described that BCAT nuclear accumulation could occur independent of ECAD (e.g.: pancreatic cancer) (33).

More studies are needed to try to understand the role of nuclear ECAD in the carcinogenesis and tumor progression.

N-CADHERIN

Normally NCAD is expressed by neural, endothelial and muscle cells, but not by epithelial cells (28)(34)(35)(36)(37).

Novel N-cadherin expression has been associated to a more invasive phenotype in many tumors, including bladder cancer (38)(39).

During the EMT occurs reduce of ECAD expression associated to an gain/novel PCAD and NCAD expression, inducing invasion and metastasis. NCAD has been related to upregulation of extracellular matrix (ECM) degrading protein expression (MMP9), promoting microenvironmental changes contributing to tumor invasion (40).

These events may occur synchronously or separated. Previous reports demonstrated a reduced or completely absence of ECAD expression in more than 80% of muscle invasive bladder cancer (MIBC) and a positive NCAD expression in more than 60% of advanced MIBC cases (28).

This is corroborated by other reports that demonstrated increasing expression of NCAD in late stage high-grade disease (34)(41)(42)(43)(44).

In our data NCAD positive expression was observed in 12 patients (35%). Considering NCAD expression, we found significantly statistics association

between NCAD positive expression (NCAD+) and ECAD nuclear expression ($p < 0.05$) in which 83% of cases were NCAD+/ECAD nuclear+.

Another important finding was that 2yr survival rate were lower in patients with NCAD positive expression when compared to NCAD negative expression ($p < 0.05$).

These findings suggest that NCAD expression could be used as possible marker of disease progression.

VIMENTIN

Previous reports suggest that VIM expression, associated to altered ECAD and BCAT expression, is associated to high-grade, stage, recurrence and metastatic progression. Is also described that VIM is mainly detected in MIBC when compared to NMIBC (30)(45)(46)(47).

Considering patients with pT2 – Urothelial Bladder Cancer (UBC), who experienced recurrence, progression disease and death, positive Vimentin expression was significantly higher than in patients with negative expression, associated to a downregulation of ECAD expression (48)(49).

Our data showed similar results to previous reports that demonstrated no association between two mesenchymal markers studied, NCAD and VIM. In contrast to results demonstrated by Baumgart et al.(30), VIM was not associated to clinicopathological variables (30). However, VIM was inversely associated to ECAD intensity ($p < 0.014$) and ECAD aberrant expression ($p < 0.023$) considering positive strong/moderate positive expression and abnormal ECAD staining.

B-CATENIN

B-catenin is one of the anchorage proteins linked to ECAD which provides structural stability and conformity to urothelial components, being part of cell-cell adhesion mechanisms (50).

Considering relationship between BCAT and ECAD expression, previous reports suggested that simultaneous aberrant expression of these molecules are associated to high grade tumors and advanced clinical stage (51)(52)(53)(54).

This down-regulation of ECAD expression is associated with BCAT linkage disruption and release of the protein to the cytosol. Once in cytosol, BCAT could be degraded by adenomatous polyposis coli (APC) complex or migrates to nucleus acting as transcriptor factor. The abnormal activation of Wnt/b-catenin signaling contributes to bladder cancer tumorigenesis, inducing cell proliferation, EMT, invasive growth and metastasis (55)(56)(57)(58).

In accordance to literature our data demonstrated significant association between BCAT and ECAD intensity ($p < 0.027$). Our results also shown that BCAT expression was negative in 70% of the cases; and, other 30% of cases that presented BCAT positive staining it occurred in the presence of strong/moderate ECAD positive expression, in concordance with previous reports that demonstrated maintenance of ECAD and BCAT expression.

STEMNESS

Previous reports showed that CD44+ human bladder cancer cells are more tumorigenic than CD44- (59)(60).

It was reported that CD44 expression are related to urothelial bladder CSCs/Tumor initiating cells (TICs) identification. The positive expression of this protein is observed in two distinct subpopulations of bladder cancer (61).

Although CD44 high staining intensity reduced cancer-specific survival in urothelial bladder cancer, when combined with further clinical parameters such grade and stage, CD44 expression did not serve as independent predicting parameters in patients that underwent radical cystectomy (61).

The “stemness” was suggested in our study as CD44 positive expression. There was a tendency of an inverse correlation between CD44 + and BCAT positive expression ($P < 0.068$). That indicates a tendency ($p < 0.068$) to correlation between CD44+ cells and the positive expression to BCAT. This could be justified because it was correlated the BCAT negative expression with more invasive tumors (BCAT negative x pT3/pT4) ($p < 0.027$).

CONCLUSION

Despite agreement with the literature that there is an aberrant expression of the various markers during the EMT process, the immunoreactivity pattern varies according to its nature (epithelial vs mesenchymal). Aberrant expression of the various epithelial markers (ECAD and BCAT) together with the appearance of mesenchymal markers (VIM and NCAD) and the association of these events with survival time and tumor staging were presented. One of the limiting factors in this study is the limited sample size. Despite this, the differential of this study is based on a specific cancer population with advanced and aggressive behavior associated to an extensive follow-up of these patients. Therefore, further investigations increasing the number of patients, creating a comparison patient's

group and including more immunohistochemistry markers are needed to achieve more consistent results.

REFERENCES

- (1) Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-eli M, Adam L, et al. Focus on bladder cancer. *Cancer Cell*. 2004;6:111–116.
- (2) Wu XR. Urothelial tumorigenesis: A tale of divergent pathways. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 5:713–725.
- (3) NCI - National Cancer Institute [webpage]. [visited in oct, 2016]. Available in: (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html#>).
- (4) Garg M. Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity: current concepts and therapeutic implications in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2015:691–701. doi:10.1007/s10555-015-9589-6.
- (5) McConkey DJ, Choi W, Marquis L, Martin F, Williams MB, Shah J, et al. Role of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in drug sensitivity and metastasis in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009; 28:335–344.
- (6) Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. MiR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin. Cancer Res*. 2009;15:5060–5072.
- (7) Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420–8.
- (8) van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone*. 2011;48:37–43.
- (9) Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:265–73.
- (10) Zhang K, Shi B, Chen J, Zhang D, Zhu Y, Zhou C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce angiogenesis and promote bladder cancer growth in a rabbit model. *Urol Int*. 2010;84:94–9.
- (11) Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796:75–90.
- (12) Xu J, Wang R, Xie ZH, Odero-Marah V, Pathak S, Multani A, et al. Prostate cancer metastasis: role of the host microenvironment in promoting epithelial to mesenchymal transition and increased bone and adrenal gland metastasis. *Prostate*. 2006;66:1664–73.
- (13) Harada K, Miyake H, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in renal cell carcinoma: impact on prognostic outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int*. 2012;110:E1131–7.

- (14) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial- mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139: 871–90.
- (15) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al, The Epithelial- Mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133:704e715 [PMID:18485877].
- (16) Kasper S. Identification, characterization, and biological relevance of prostate cancer stem cells from clinical specimens. *Urol Oncol*. 2009;27:301–3.
- (17) Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK, Behrens MD, Nassar A, Kalli KR, et al. Immune-induced epithelial-to-mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer Res*. 2009;69:2887–95
- (18) Jiang F, Ma S, Xue Y, Hou J, Zhang Y. LDH-A promotes malignant progression via activation of epithelial-to-mesenchymal transition and conferring stemness in muscle-invasive bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;469:985–92. doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.078
- (19) Olivo M, Lucky SS, Frederick J, Mancer K, et al. Altered expression of cell adhesion molecules leads to differential uptake of hypericin in urothelial cancer. *URO* 2012;30:624–34. doi:10.1016/j.urolonc.2010.07.006.
- (20) Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS. Bladder cancer. *Lancet* 2009;374:239–49.
- (21) Hu H, Wang YL, Wang GW, Wong YC, Wang XF, Wang Y, et al. A novel role of Id-1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer. *Urol Oncol* 2013;31:1242–53. doi:10.1016/j.urolonc.2011.12.003.
- (22) Heney NM, Ahmed S, Flanagan MJ, Frable W, Corder MP, Haferman MD, et al. Superficial bladder cancer: Progression and recurrence. *J Urol* 1983;130:1083–6.
- (23) Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Algaba F, Vicente-Rodriguez J, et al. Primary superficial bladder cancer risk groups according to progression, mortality and recurrence. *J Urol* 2000;164:680–4.
- (24) Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat Med* 2009;15:1010–2.
- (25) Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, He X, Ling S, Schaeffer EM, et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:291–304. (doi:10.1007/s10555-009-9187-6)
- (26) Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science*. 2009;324, 1670–1673. (doi:10.1126/science.1171837)
- (27) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646–674. (doi:10.1016/j.cell.2011.02.013)
- (28) Bryan RT, Tselepis C. Cadherin switching and bladder cancer. *J Urol* 2010;184:423-31.

- (29) Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 2006; 66:11271-8.
- (30) Baumgart E, Cohen MS, Silva Neto B, Jacobs MA, Wotkowicz C, Rieger-Christ KM, et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res.* 2007;13: 1685-94.
- (31) Kenney PA, Wszolek MF, Rieger-Christ KM, Neto BS, Gould JJ, Harty NJ, et al. Novel ZEB1 expression in bladder tumorigenesis. *BJU Int.* 2011; 107:656-63.
- (32) Keck B, Wach S, Kunath F, Bertz S, Taubert H, Lehmann J, et al. Nuclear E-cadherin Expression is Associated with the Loss of Membranous E-cadherin, Plasmacytoid Differentiation and Reduced Overall Survival in Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Ann Surg Oncol.* 2012;20:2440–5. doi:10.1245/s10434-012-2709-4)
- (33) El-Bahrawy MA, Rowan A, Horncastle D, et al. E-cadherin/ catenin complex status in solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:1–7.
- (34) Bryan RT. Cell adhesion and urothelial bladder cancer: the role of cadherin switching and related phenomena. *Phil Trans R Soc B.* 2015;370:20140042. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0042>
- (35) Wheelock MJ, Knudsen KA. Cadherins and associated proteins. *In vivo.* 1991;5: 505–513.
- (36) Rieger-Christ KM, Cain JW, Braasch JW, Dugan JM, Silverman ML, Bouyounes B, et al. Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. *Hum Pathol.* 2001;32:18–23. (doi:10.1053/hupa.2001.21140)
- (37) Nollet F, Kools P, van RF. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* 2000;299: 551–572. (doi:10. 1006/jmbi.2000.3777)
- (38) Giroldi LA, Bringuier PP, Shimazui T, Jansen K and Schalken JA. Changes in cadherin-catenin complexes in the progression of human bladder carcinoma. *Int J Cancer.* 82: 70-76, 1999.
- (39) Hazan RB, Kang L, Whooley BP and Borgen PI: N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun.* 4: 399-411, 1997.
- (40) Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M., & Hazan, R. B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell.* 2002;2:301–314.
- (41) Bryan RT, Atherfold PA, Yeo Y, Jones LJ, Harrison RF, Wallace DM, et al. Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies. *J Pathol.* 2008;215:184–194. (doi:10.1002/path.2346)

- (42) Wang P, Lin SL, Zhang LH, Li Z, Liu Q, Gao JX, et al. The prognostic value of P-cadherin in non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40:255–259. (doi:10.1016/j.ejso.2013.12.018)
- (43) Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Kantelip B, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2780–2787. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2387)
- (44) Mandeville JA, Neto BS, Vanni AJ, Smith GL, Rieger-christ KM, Zeheb R, et al. P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *BJU Int*. 2008;102:1707–1714. (doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08115.x)
- (45) Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 2010;24:1838-51.
- (46) Yun SJ, Kim WJ. Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol*. 2013;54:645–50. doi:10.4111/kju.2013.54.10.645
- (47) Paliwal P, Arora D, Mishra AK. Epithelial mesenchymal transition in urothelial carcinoma: twist in the tale. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012;55:443-9.
- (48) Zhao J, Dong D, Sun L, Zhang G, Sun L. Prognostic significance of the epithelial-to-mesenchymal transition markers e-cadherin, vimentin and twist in bladder cancer. *Int Braz J Urol* 2014;40:179–89. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.02.07
- (49) Khorrami MH, Hadi M, Gharaati MR, Izadpanahi MH, Javid A, Zargham M: E-cadherin expression as a prognostic factor in transitional cell carcinoma of the bladder after transurethral resection. *Urol J*. 2012; 9: 581-5
- (50) Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 2007;7:415-28.
- (51) Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased Ecadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res*. 1993; 53: 3241–5.
- (52) 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; 160: 1889–93.
- (53) Shimazui T, Schalken JA, Girolidi LA, Jansen CF, Akaza H, Koiso K, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (a-, b-, and g-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res*. 1996; 56: 4154–8.

- (54) Garcia del Muro X, Torregrosa A, Muñoz J, Castellsagué X, Condom E, Vigués F, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and b-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer*. 2000; 36: 357–62.
- (55) van der Horst G, Bos L, van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells, and the tumor-supportive stroma in bladder carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2012;10:995-1009.
- (56) Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 ;16:51–59
- (57) Ahmad I., Morton J.P., Singh L.B., Radulescu S.M., Ridgway R.A., Patel S., et al. Beta- Catenin activation synergizes with PTEN loss to cause bladder cancer formation, *Oncogene*. 2011;30(2):178–189.
- (58) Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, Mauny F, Félix S, Algros M-P, et al. Expression of E-Cadherin and α -, β -, γ -Catenins in Patients With Bladder Cancer. *Am J Clin Pathol [Internet]*. 2006;125(1):119–26.
- (59) Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular character- ization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor–initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14016–21.
- (60) Syed IS, Pedram A, Farhat WA. Role of Sonic Hedgehog (Shh) Signaling in Bladder Cancer Stemness and Tumorigenesis. *Curr Urol Rep*. 2016;17(2):11. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11934-015-0568-9>
- (61) Hofner T, Macher-Goeppinger S, Klein C, Schillert A, Eisen C, Wagner S, et al. Expression and prognostic significance of cancer stem cell markers CD24 and CD44 in urothelial bladder cancer xenografts and patients undergoing radical cystectomy. *Urol Oncol* 2014;32:678–86. doi:10.1016/j.urolonc.2014.01.001

ATTACHMENT

Figure 1

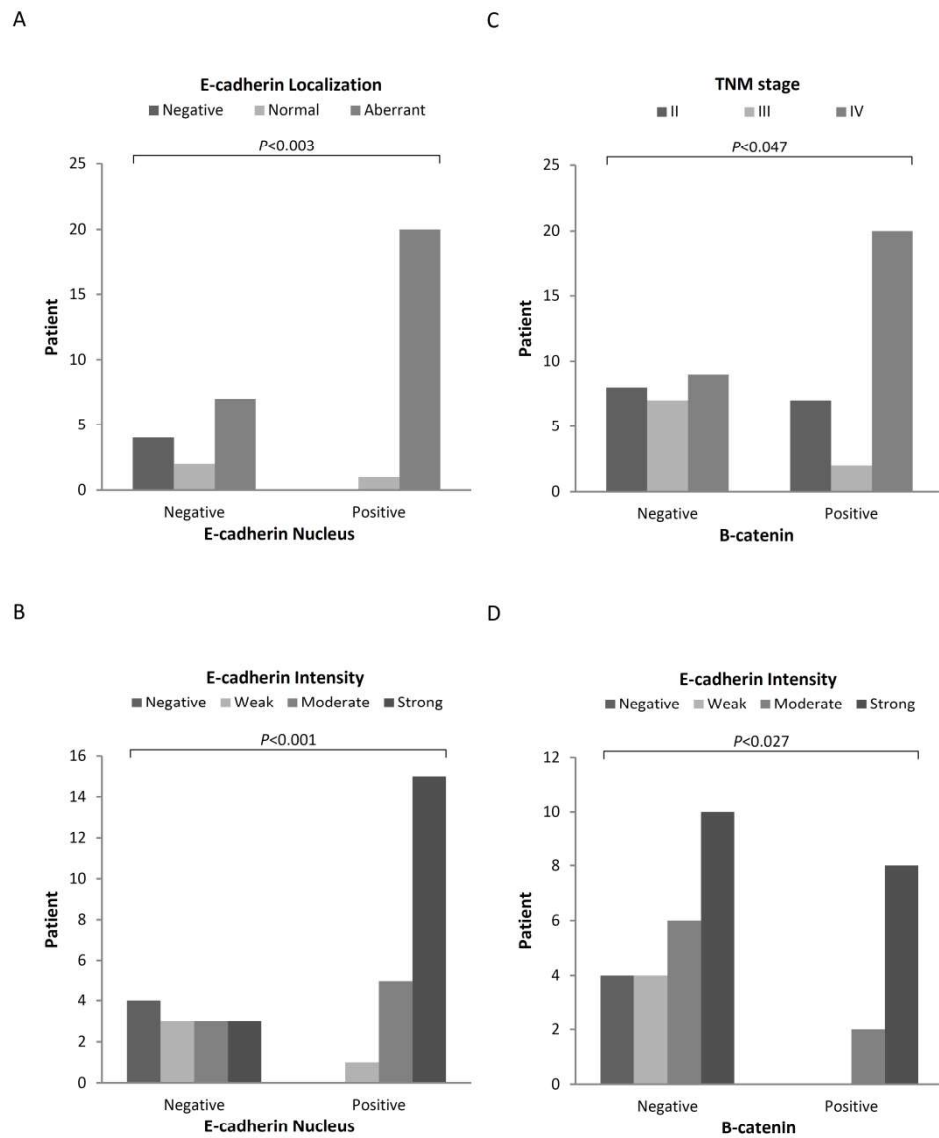


Figure 1. Association between clinical and immunohistochemical markers in high-grade muscle invasive bladder cancer patients. Note: A) E-cadherin localization vs. E-cadherin nucleus; B) E-cadherin intensity vs. E-cadherin nucleus; C) TNM stage vs. B-catenin; D) E-cadherin intensity vs. B-catenin.

Table 1

Table 1. Characteristics of the study baseline.

Variables	N=34
Male, n (%)	25 (73)
Age in years, mean±SD	66±9
Pathologic stage, n (%)	
T2	15 (45)
T3	9 (26)
T4	10 (29)
High-Grade, n (%)	34 (100)
E-cadherin, n (%)	
Intensity	
Negative	4 (12)
Weak	4 (12)
Moderate	8 (23)
Strong	18 (53)
Localization	
Negative	4 (12)
Normal	3 (8)
Aberrant	27 (80)
Nucleus	
Negative	13 (38)
Positive	21 (62)
B-catenin, n (%)	
Positive	24 (71)
Negative	10 (29)
CD44, n (%)	
Negative	19 (56)
Positive	15 (44)
Vimentin, n (%)	
Negative	20 (59)
Positive	14 (41)
N-cadherin, n (%)	
Negative	22 (65)
Positive	12 (35)

Note: Data are presented as No. (%) or mean ± SD.

Table 2

Table 2. Association between clinical and immunohistochemical markers in high-grade muscle invasive bladder cancer patients.

Variables	E-cadherin intensity	E-cadherin localization	E-cadherin nucleus	B-catenin	Stage	CD44	Vimentin	N-cadherin
E-cadherin intensity	-	<0.001	0.001	0.027	-	-	0.014	-
E-cadherin localization	<0.001	-	0.003	-	-	-	0.023	-
E-cadherin nucleus	0.001	0.003	-	-	-	-	-	0.05
B-catenin	0.027	-	-	-	0.047	-	-	-
Stage	-	-	-	0.047	-	-	-	-
CD44	-	-	-	-	-	-	-	-
Vimentin	0.014	0.023	-	-	-	-	-	-
N-cadherin	-	-	0.05	-	-	-	-	-

Note: Statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

Figure 2

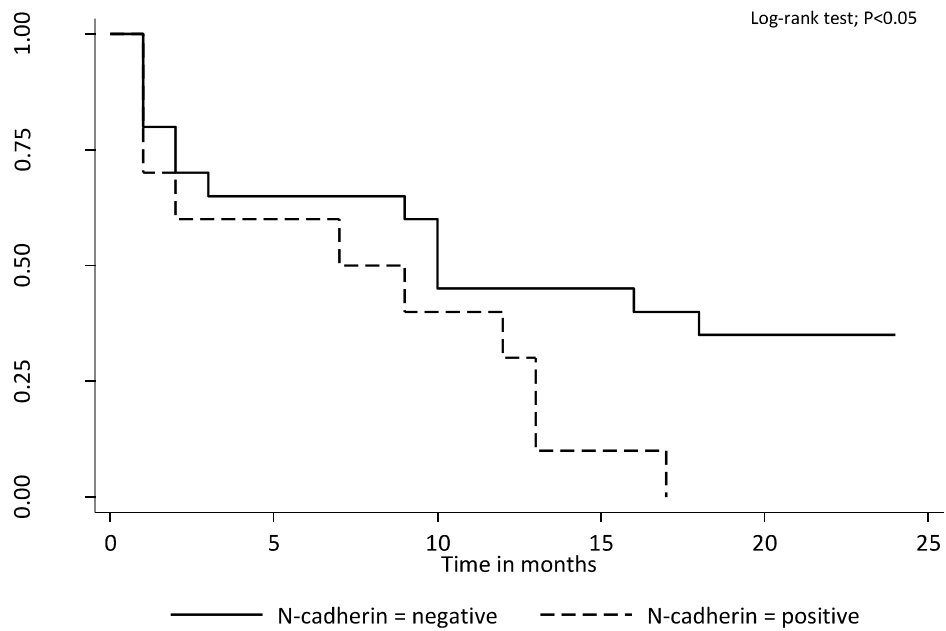


Figure 2. Kaplan-Meier plot of cumulative probability survival, for patients with positive or negative immunohistochemistry expression of N-cadherin.

4. Considerações finais

O presente trabalho visa dar continuidade a projetos envolvendo o processo da Transição Epitélio-Mesenquimal – Invasão e Progressão Tumoral, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Adriana Vial Roehe.

Esta dissertação buscou apresentar os resultados da expressão de marcadores imunistoquímicos relacionados ao processo EMT e sua associação com fatores prognósticos e sobrevida no carcinoma urotelial de bexiga. De maneira geral, os resultados obtidos foram similares aos esperados. Entretanto, o número restrito de pacientes participantes do estudo aliado à ausência de um grupo controle, foram considerados como fatores limitantes neste estudo.

Uma das características diferenciais do estudo é o tempo de seguimento dos pacientes e sua característica – Carcinoma Urotelial de Bexiga de Alto-Grau Músculo-Invasor. Em geral, a literatura apresenta estudos que realizam a comparação entre tumores de baixo-grau não-invasores x tumores de alto-grau músculo-invasores.

O estudo da EMT no processo de invasão tumoral é uma das etapas fundamentais da progressão da doença. A sua relação com outros mecanismos como *stemness* e células-tronco tumorais busca elucidar questões vitais na compreensão da tumorigênese, desenvolvimento e progressão tumorais.

5. Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA N-CADERINA E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE E-CADERINA E VIMENTINA EM CARCINOMAS UROTÉLIAIS DE BEXIGA DE ALTO GRAU

Pesquisador: Adriana Vial Roehe

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37938614.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 882.754

Data da Relatoria: 19/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo que objetiva estudar a expressão imunohistoquímica da proteína N-caderina e sua relação com a expressão de E-caderina e Vimentina, envolvidas no processo da transição epitélio-mesenquimal, no carcinoma urotelial de bexiga de alto grau, correlacionando com a sobrevida total de pacientes submetidos à cistectomia radical.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Estudar o perfil de expressão da proteína N-caderina, através da técnica de imunohistoquímica, em pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de bexiga de alto grau submetidos à cistectomia radical.
Específicos:

- Estudar e quantificar, através de análise digital de imagem, a expressão imunohistoquímica do marcador N-caderina nos casos de carcinoma urotelial de bexiga de alto grau;
- Correlacionar a expressão imunohistoquímica da N-caderina, no carcinoma urotelial de bexiga de alto grau com as variáveis: a- estágio tumoral b- presença de metástases c- sobrevida total d- expressão imunohistoquímica dos marcadores E-caderina e vimentina (já realizada em estudo anterior).

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 882.754

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisa não oferece risco aos sujeitos, pois será realizado apenas o estudo de um marcador imunohistoquímico em material emblocado em parafina do período de 2000-2004.

Benefícios:

Serão relacionados à compreensão da carcinogênese do câncer de bexiga de alto grau.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância clínica, viabilizando a inclusão de novos marcadores diagnósticos para o carcinoma urotelial de bexiga de alto grau.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Como trata-se de utilização de material depositado no laboratório, anterior a 2004, com objetivo semelhante a projeto anterior previamente aprovado e documentado, apenas incluindo um marcador diagnóstico. Os termos apresentados estão adequados a proposta apresentada, havendo dispensa do TCLE.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está adequado para ser desenvolvido, tendo como período de realização março de 2015 a novembro de 2016.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o Parecer do Relator.

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245
Bairro: CEP: 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 882.754

PORTO ALEGRE, 24 de Novembro de 2014

Assinado por:
Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmiento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br