

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO
DE E-CADERINA NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES
COM CARCINOMA UROTELIAL DE Pelve Renal e
URETER ESPORÁDICO, SUBMETIDOS À
NEFROURETERECTOMIA RADICAL: UM ESTUDO
COLABORATIVO INTERNACIONAL**

RICARDO DE LIMA FAVARETTO

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Stênio de Cássio Zequi

Coorientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Favaretto, Ricardo de Lima

Avaliação imuno-histoquímica da expressão de e-caderina no prognóstico de pacientes com carcinoma urotelial de pelve renal e ureter esporádico, submetidos à nefroureterectomia radical: um estudo colaborativo internacional / Ricardo de Lima Favaretto – São Paulo; 2017.

140p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1. Nefrectomia/Nephrectomy. 2. Caderinas/Cadherins. 3. Pelve Renal/Kidney Pelvis. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Ureter/Ureter. 6. Carcinoma/Carcinoma. 7. Prognóstico/Prognosis. 8. Estudo Multicentrico.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elio e Graça, que com muito trabalho dedicaram suas vidas para a formação e educação dos seus filhos.

À minha esposa Isabella, minha paixão desde sempre, mãe exemplar e companheira incondicional. Não mediu esforços ou sacrifícios em me apoiar e me acompanhar em todas as fases de minha formação. Por seu carinho, amor e dedicação à essa família maravilhosa que construímos. Com certeza, sem ela, nada disso seria possível.

Aos meus filhos Gabriel e Natália, razão de toda nossa dedicação e sacrifício.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Stênio de Cássio Zequi, orientador da minha tese. Por todo seu apoio, profissionalismo, orientação e amizade. Um profissional extremamente versátil, humano e competente, cuja dedicação inexorável ao paciente, à pesquisa, aos alunos e à instituição servem como exemplo a ser seguido.

À Dra. Isabela Werneck da Cunha, minha coorientadora. Pela sua sabedoria, profissionalismo e apoio, e cuja dedicação à patologia genito-urinária impulsionaram este e diversos outros projetos colaborativos.

Ao Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, chefe do Núcleo de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center. Um profissional brilhante e completo, além de um líder nato, o qual dirige a equipe de Urologia com dedicação total, visão empreendedora e extrema responsabilidade. Pela grande amizade, por seus conselhos e ensinamentos, por ter apostado na minha capacidade, e por ter me proporcionado grandes oportunidades que mudaram a minha vida, tanto no A.C.Camargo quanto fora dele.

Ao Dr. Shahrokh F. Shariat, chefe do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Vienna – Áustria, e toda sua equipe de urologistas, fellows, patologistas e estatísticos, por proporcionar essa grande oportunidade de colaboração internacional entre nossas instituições.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica e vice-presidente da Fundação Antônio Prudente, pelo exemplo de dedicação à essa instituição e pela infinita sabedoria, sempre disposto a compartilhá-la conosco.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, diretor do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, e toda sua equipe de patologistas, pela receptividade, competência e sempre preciosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Júnior, eterno mestre, que foi o primeiro a me mostrar a importância da pesquisa e das publicações na vida do profissional médico.

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, amigo de longa data e companheiro das atividades diárias, por sua preciosa contribuição no desenvolvimento e conclusão dessa tese.

Aos Drs. Renato Almeida Rosa de Oliveira e Thiago Borges Marques Santana, grandes amigos, companheiros de hoje e sempre, pela disposição, energia, dedicação e pelos sempre preciosos ensinamentos compartilhados na nossa prática diária.

Aos companheiros diários do Núcleo de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center Dr. Wilson Bachega, Dr. Rodrigo Sousa Madeira Campos, Dr. Carlos Alberto Ricetto Sacomani, Dr. Bruno Benigno, Dr. Mauricio Murce, Dr. Lucas Fornazieri, Dr. Rafael Meduna, pelo espírito de equipe, amizade e disposição.

À Thais Safranov Giuliangelis, enfermeira de pesquisa do Núcleo de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center, pela atenção e energia, e pela sua contribuição para o andamento desse projeto.

À instituição A.C.Camargo Cancer Center, pela possibilidade de aprendizado inestimável proporcionado pelos seus integrantes, professores e, principalmente, pelos seus pacientes.

À Sra. Suely Francisco, bibliotecária do A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio e dedicação durante o processo de revisão e levantamento bibliográfico desse trabalho.

Às Sras. Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira da Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center, pela ajuda e atenção.

RESUMO

Favaretto RL. **Avaliação imuno-histoquímica da expressão de e-caderina no prognóstico de pacientes com carcinoma urotelial de pelve renal e ureter esporádico, submetidos à nefroureterectomia radical: um estudo colaborativo internacional.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma urotelial de trato urinário superior (CUTS) é um tumor relativamente raro e agressivo. A nefroureterectomia radical (NUR) permanece o tratamento de escolha para tumores de alto risco não metastático. Por outro lado, o tratamento conservador pode ser considerado para tumores menos agressivos. Assim sendo, a correta identificação desses pacientes é essencial para a tomada de decisões terapêuticas em CUTS. Entretanto, os fatores clínico-patológicos se mostram até então limitados para esse fim. Dessa forma, a identificação e validação de biomarcadores é extremamente importante no sentido de desenvolver ferramentas prognósticas com alta acurácia que possam guiar condutas em CUTS. Nós utilizamos uma grande casuística multi-institucional com o objetivo de avaliar a expressão imuno-histoquímica de E-caderina e seu papel prognóstico em pacientes com diagnóstico de CUTS submetidos à NUR. **Materiais e métodos:** Técnica imuno-histoquímica foi utilizada para avaliar a expressão de E-caderina em 678 pacientes provenientes de 7 instituições de referência, diagnosticados com CUTS esporádico e tratados por NUR. As análises patológicas foram centralizadas no Departamento de Patologia da Universidade de Vienna, Áustria. Considerou-se diminuição na expressão de E-caderina se 10% ou mais células tiveram expressão diminuída (<90%). **Resultados:** Dois artigos foram formulados provenientes desse trabalho. O primeiro foi um artigo de revisão avaliando em detalhes os diversos marcadores moleculares teciduais e seu papel prognóstico em CUTS. As expressões de alguns marcadores estiveram associadas a tumores com características mais agressivas, como o p53, Ki-67, EGFR, HER-2, marcadores de angiogênese (HIF1 α , VASH1 e TSP-1), snail, Uroplaquinas, E-caderina, N-caderina e survivina. Outro marcador, como o FGFR3, esteve associado a tumores de baixo risco. Identificou-se alguns

marcadores associados a recorrência vesical, como o Ki-67, HER-2, EGFR e N-caderina; enquanto outros se mostraram promissores como fatores prognósticos de sobrevida, como o p53, Ki-67, HER-2 e MMP 11. O segundo artigo avaliou a expressão imuno-histoquímica de E-caderina em lâminas de *tissue microarray* (TMA) de 678 pacientes com CUTS unilateral e esporádico submetidos à NUR. Praticamente metade dos pacientes (52%) tiveram diminuição na expressão de E-caderina e estavam associados com estágio patológico mais avançado ($p<0,001$), alto grau histológico ($p<0,001$), metástases linfonodais ($p=0,006$), invasão linfovascular ($p<0,001$), carcinoma *in situ* associado ($p<0,001$), multifocalidade ($p=0,004$), necrose tumoral ($p=0,020$) e arquitetura tumoral séssil ($p<0,001$). Após um seguimento mediano de 30 meses, 171 pacientes (25,4%) apresentaram recorrência tumoral e 150 (21,9%) morreram da doença. Na análise univariada, pacientes com diminuição na expressão de E-caderina estiveram significativamente associados a uma pior sobrevida livre de recorrência (SLR) ($p<0,001$) e sobrevida câncer-específica (SCE) ($p=0,006$). Entretanto, na análise multivariada, não houve associação entre a diminuição na expressão de E-caderina e SLR ($p=0,74$) e SCE ($p=0,84$). A falta de valor prognóstico independente da E-caderina também foi identificada nas análises de subgrupo. **Conclusão:** A diminuição na expressão de E-caderina em pacientes com CUTS submetidos à NUR esteve associada à características de doença agressiva e pior sobrevida na análise univariada, entretanto, não foi um fator prognóstico independente na análise multivariada.

SUMMARY

Favaretto RL. **[Immunohistochemical expression of E-cadherin and its prognostic role in patients with upper tract urothelial carcinoma submitted to radical nephroureterectomy: an international collaboration study]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Upper tract urothelial carcinoma (UTUC) is a relatively rare and aggressive disease. Radical nephroureterectomy (RNU) remains the standard treatment for high risk non-metastatic UTUC. Conversely, conservative treatment can be considered for low grade low stage disease. So the correct identification of these patients is crucial for clinical decision-making in UTUC. However, clinical and pathological prognostic factors still represents a major deficiency in accurately stratify patients for treatment decisions. Therefore, identification and validation of biomarkers is mandatory to develop predictive tools that could allow accurate clinical decision-making in the management of UTUC patients. In this regard, we analyzed and assessed the role of E-cadherin as prognostic biomarker in UTUC in a large multi-institutional cohort of patients submitted to RNU. **Materials and methods:** Immunohistochemistry technique was used to evaluate E-cadherin expression in 678 patients from 7 different institutions diagnosed with sporadic UTUC and treated with RNU. Pathological specimens were analyzed together in a centralized pathology at Medical University of Vienna – Austria. E-cadherin expression was considered decreased if 10% or more cells had decreased expression (<90%). **Results:** Two studies were formulated. The first study was a review article describing in detail the currently available data on tissue-based markers and its prognostic impact in UTUC. Some molecular markers were useful for predicting aggressive disease like p53, Ki67, EGFR, HER-2, angiogenesis related markers (HIF1 α , VASH1 and TSP-1), snail, Uroplakins, E-cadherin, N-cadherin and survivin, while other like FGFR were related to low risk tumors. Evidence supported some tissue-based markers as independent prognostic factors for bladder cancer recurrence, like Ki-67, HER-2, EGFR and N-cadherin; while others seemed to be

promising tools as prognostic factors for survival, like p53, Ki-67, HER-2 and MMP 11. The second study evaluated the immunohistochemical expression of E-cadherin in tissue microarray slides from 678 patients with unilateral, sporadic UTUC treated with RNU. Decreased E-cadherin expression was observed in 52% of patients and was associated with advanced pathological stage ($p < 0.001$), higher grade ($p < 0.001$), lymph node metastasis ($p = 0.006$), lymphovascular invasion ($p < 0.001$), concomitant carcinoma in situ ($p < 0.001$), multifocality ($p = 0.004$), tumor necrosis ($p = 0.020$) and sessile architecture ($p < 0.001$). Within a median follow-up of 30 months (interquartile range: 15-57) 171 patients (25.4%) experienced disease recurrence and 150 (21.9%) died from UTUC. In univariable analyses, decreased E-cadherin expression was significantly associated with worse recurrence-free survival (RFS) ($P < 0.001$) and cancer-specific survival CSS ($P = 0.006$); however, in multivariable analyses, it was not ($P = 0.74$ and 0.84 , respectively). The lack of independent prognostic value of E-cadherin remained true in all subgroup analyses.

Conclusion: In UTUC patients treated with RNU, decreased E-cadherin expression was associated with features of biologically and clinically aggressive disease and worse survival outcomes in univariate analyses, however, it was not an independent prognostic factor in multivariable analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estratificação de risco pré-intervenção em pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de pelve renal e ureter.....	12
Figura 2	Linfadenectomia pélvica e retroperitoneal estendida proposta para pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de pelve renal e ureter.....	16
Figura 3	E-caderina e o processo de aderência celular.....	47
Figura 4	O processo de transição epitélio-mesênquima.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL-2	B-cell lymphoma 2
CIS	Carcinoma in situ
CpG	Citosina – fosfato – Guanina
CU	Carcinoma urotelial
CUB	Carcinoma urotelial de bexiga
CUTS	Carcinoma urotelial de trato urinário superior
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Group - Performance Status
EGFR	Epidermal growth fator receptor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FISH	Fluorescent in situ hybridization
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
ILV	Invasão linfovascular
IMC	Índice de massa corporal
IRC	Insuficiência renal crônica
HNPCC	Carcinoma colo-retal hereditário não-polipóide
KPS	Karnofsky Performance Status
MIS	Instabilidade microssatélite
MMP	Metaloproteinase
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-κB	Nuclear factor - κB
NUR	Nefroureterectomia radical
PDGR	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLR	Sobrevida livre de recorrência metastática
TEM	Transição epitélio-mesênquima
TNM	Tumor-node-metastasis

TSP-1	Thrombospondin-1
UP	Uroplakin
VASH-1	Vasohibin-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Razões do Estudo	1
1.2	Revisão da Literatura	5
1.2.1	Epidemiologia	5
1.2.2	Histologia, Classificação e Estadiamento	8
1.2.3	Diagnóstico	9
1.2.4	Estratificação de Risco	11
1.2.5	Tratamento	12
1.2.5.1	Doença Localizada	12
1.2.5.2	Linfadenectomia.....	15
1.2.5.3	Quimioterapia perioperatória	16
1.2.5.4	Tratamento Conservador.....	17
1.3	Fatores Prognósticos	19
1.3.1	Fatores pré-operatórios ou Clínicos	20
1.3.2	Fatores intra-operatórios ou Cirúrgicos	24
1.3.3	Fatores pós-operatórios ou Patológicos	26
1.3.4	Nomogramas	30
1.3.5	Marcadores Moleculares	33
1.3.5.1	Marcadores Sanguíneos	34
1.3.5.2	Marcadores Urinários.....	35
1.3.5.3	Marcadores Genéticos.....	36
1.3.5.4	Marcadores Teciduais	38
1.3.5.5	As Caderinas	46
2	ARTIGO 1	52
2.1	Tissue-based Molecular Markers in Upper Tract Urothelial Carcinoma and its Prognostic Implications	52

3	ARTIGO 2	89
3.1	Prognostic role of decreased E-Cadherin expression in patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study	89
4	DISCUSSÃO.....	111
5	CONCLUSÕES	117
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Estadiamento TNM 2009 do carcinoma urotelial de pelve renal e ureter

Anexo 3 Classificação de performance/status do ECOG: Eastern Cooperative Oncologic Group Performance Status Classification.

Anexo 4 Classificação do performance/status do KPS: Karnofsky Performance Status Scale.

Anexo 5 Ficha de levantamento de dados.

Anexo 6 Carta de submissão do artigo 1 para International Brazilian Journal of Urology

1 INTRODUÇÃO

1.1 RAZÕES DO ESTUDO

Os carcinomas uroteliais são neoplasias derivadas do urotélio e podem estar localizados em qualquer segmento do trato urinário inferior (bexiga e uretra) ou superior (cavidades pielocaliciais e ureter).

O carcinoma urotelial de pelve renal e ureter, também conhecido como carcinoma urotelial de trato urinário superior (CUTS), é uma neoplasia relativamente rara, podendo corresponder de 5% a 10% (MUNOZ et al. 2000) dos carcinomas uroteliais e a quase 10% dos tumores renais (RAMAN et al. 2011a). A nefroureterectomia radical (NUR) com a retirada do *cuff* de bexiga (porção intramural vesical do ureter) é considerada a terapia padrão para o CUTS (ROUPRÊT et al. 2015). De acordo com a diretriz da National Comprehensive Cancer Network - NCCN (2017), a linfadenectomia regional e a quimioterapia perioperatória podem ser consideradas em casos de pacientes com doença de alto risco (estadiamento TNM pT2 ou >; N+; alto grau; multifocal), assim como uma terapia mais conservadora (resseção ureteral segmentar ou ablação endoscópica) pode ser considerada em pacientes com doença de baixo risco (estadiamento TNM < pT2; baixo grau; unifocal; lesão < 1 cm).

O CUTS é uma neoplasia que apresenta uma evolução geralmente heterogênea. Pacientes com tumores não invasivos e de baixo grau possuem uma sobrevida livre de doença (SLD) em dez anos acima de 90% após a NUR

(MARGULIS et al. 2009). Como comentado anteriormente, esses pacientes poderiam ser tratados de forma mais conservadora. Dessa forma, poderiam evitar a ressecção completa do rim e, conseqüentemente, os riscos aumentados de doença renal crônica e eventos cardiovasculares (MILLER et al. 2008). Ao contrário, pacientes com tumores de alto grau e invasivos possuem uma alta probabilidade de recorrência e progressão, sendo muitas vezes necessária uma terapia mais agressiva e multimodal, incluindo quimioterapia perioperatória, assim como uma linfadenectomia estendida na ocasião da NUR (KONDO et al. 2007b; MARGULIS et al. 2009).

Dessa forma, a correta identificação e estadiamento pré-operatório desses pacientes são essenciais para guiar decisões em CUTS. No sentido de ajudar a selecionar a melhor abordagem terapêutica e a melhor estratégia de seguimento, vários trabalhos foram publicados sobre os diversos fatores prognósticos em pacientes com CUTS (fatores pré-operatórios ou clínicos, fatores intraoperatórios ou cirúrgicos, fatores pós-operatórios ou patológicos e marcadores moleculares) (FAVARETTO et al. 2010a e b; SHARIAT et al. 2011; LUGHEZZANI et al. 2012). Alguns autores, utilizando fatores pré-operatórios, criaram nomogramas com intuito de prever tumores mais agressivos antes da indicação terapêutica (BRIEN et al. 2010; MARGULIS et al. 2010; FAVARETTO et al. 2012). A acurácia preditiva desses modelos matemáticos baseados em análises multivariadas variou de 70% a 80%. Uma forma de talvez melhorar a previsão de tumores em CUTS seria através da utilização de marcadores moleculares.

Marcadores moleculares são moléculas produzidas pelas células tumorais, as quais podem ser detectadas e mensuradas em tecidos, sangue ou urina.

Biomarcadores ideais são aqueles que teriam a habilidade de melhorar a acurácia preditiva quando integrados em modelos prognósticos já existentes no sentido de permitir um melhor aconselhamento ao paciente quanto à tomada de decisões (SVATEK et al. 2009). A utilidade prognóstica de marcadores moleculares teciduais está bem estabelecida em carcinoma urotelial de bexiga (CUB), demonstrando habilidade para prever progressão em tumores não músculo-invasivos, assim como evolução clínica e patológica em pacientes tratados por cistectomia radical (SHARIAT et al. 2007 e 2008). Entretanto, evidências sugerem que o mecanismo de carcinogênese em CUTS é diferente se comparado aos tumores uroteliais de trato urinário inferior, sendo que alterações moleculares de um não podem ser extrapoladas em outro (GREEN et al. 2013; YATES et al. 2013). No caso de CUTS, por ser uma doença rara, existe um número limitado de artigos que estudam marcadores moleculares, sendo a maioria composta por estudos retrospectivos, com amostra pequena e seguimento curto. A maioria das publicações de marcadores moleculares em CUTS é de estudos que avaliam expressões de proteínas teciduais envolvidas na regulação do ciclo celular, apoptose, proliferação celular, diferenciação, angiogênese e adesão celular. Alguns marcadores já estão bem estabelecidos como fatores prognósticos independentes em CUTS, como o p53, Ki67 e o HER-2 (KU et al. 2013; KRABBE et al. 2015; SORIA et al. 2016), enquanto outros, como as moléculas de adesão, ainda levantam muitas controvérsias.

Em muitos estudos que envolvem diversas neoplasias sólidas, pacientes com diminuição da expressão de E-caderina carregam tumores com características biológicas de doença agressiva (JEANES et al. 2008; WHEELLOCK et al. 2008). Essa associação está de acordo com o papel biológico da E-caderina, descrita como

uma glicoproteína dependente de cálcio, essencial para a manutenção da integridade tecidual epitelial. Dessa forma, a perda da adesão celular resulta em desprendimento das células cancerosas da lesão primária, promovendo o processo de invasão e metástase (FRIXEN et al. 1991). No CUB, o envolvimento da E-caderina na progressão da doença invasiva, assim como o seu papel como um marcador prognóstico independente na recorrência, progressão e sobrevida câncer-específica desses pacientes, tem sido bem descritos (GIROLDI et al. 1999; SHARIAT et al. 2001; ERDEMIR et al. 2007; MURAMAKI et al. 2010). Entretanto, estudos que analisaram o papel da diminuição da expressão da E-caderina em pacientes diagnosticados com CUTS tiveram resultados conflitantes.

Em 1997, NAKANISHI et al. identificaram uma associação entre a diminuição da expressão de E-caderina e características tumorais biologicamente agressivas, como estágio tumoral avançado, alto grau histológico e padrão de crescimento tumoral em 154 pacientes com CUTS submetidos à NUR. Entretanto, os autores falharam em demonstrar o papel prognóstico independente da expressão de E-caderina nas análises de sobrevida. Mais tarde, FROMONT et al. (2005) publicaram um trabalho que analisou um painel de diversos marcadores moleculares em 62 pacientes submetidos à NUR por CUTS e com seguimento médio de 25 meses. A diminuição da expressão de E-caderina não esteve associada a nenhum fator clínico ou patológico, mas, na análise multivariada, foi considerada um fator prognóstico independente para sobrevida global (SG) e SLD. Nos anos seguintes, poucos trabalhos foram publicados sobre o assunto, e nenhuma publicação conseguiu validar os resultados de FROMONT et al. (2005) considerando o valor prognóstico independente da expressão de E-caderina nas análises de sobrevida. Entretanto, são

trabalhos em centros únicos, amostras pequenas e seguimento curto (MURAMAKI et al. 2011; REIS et al. 2012; STOJNEV et al. 2015). Dessa forma, ainda se discute o real papel da expressão de E-caderina como fator prognóstico independente e sua associação com características patológicas agressivas em CUTS.

Por essa razão, propomos um grande estudo colaborativo internacional envolvendo sete instituições internacionais e patologia centralizada com os seguintes objetivos:

- Verificar a associação entre a diminuição da expressão de E-caderina com fatores patológicos característicos de doença agressiva (estádio patológico avançado – pT3 ou maior, alto grau tumoral, metástase linfonodal).
- Verificar a associação entre a diminuição da expressão de E-caderina com a sobrevida livre de recorrência metastática (SLR) e sobrevida câncer-específica (SCE).

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Epidemiologia

Os carcinomas uroteliais podem estar localizados tanto no trato urinário inferior (bexiga e uretra) quanto superior (cavidades pielocaliciais e ureter). Os tumores de bexiga são considerados os carcinomas uroteliais mais frequentes (SIEGEL et al. 2012), correspondendo a 90-95% dos casos. Já os carcinomas uroteliais de trato urinário superior são neoplasias relativamente raras, que correspondem a apenas 5-10% dos tumores uroteliais e a 10% dos tumores renais

(MUNOZ et al. 2000; RAMAN et al. 2011a). RAMAN et al. (2011a) publicaram artigo em 2011, que analisou a incidência de CUTS nos Estados Unidos, entre 1973 e 2005, utilizando os registros da base de dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*). Os autores identificaram um aumento na incidência de 1,88 para 2,06 casos por 100.000 habitantes/ano no período estudado.

O CUTS é considerado um tumor relativamente agressivo com alto potencial de recidiva e progressão. Aproximadamente 60% dos CUTS são invasivos ao diagnóstico, diferentemente do CUB, no qual apenas 15 a 25% possuem doença invasiva ao diagnóstico (MARGULIS et al. 2009). Entretanto, a evolução e o prognóstico da doença são extremamente heterogêneos e dependem basicamente do estágio TNM e do grau da lesão. Pacientes com tumores não invasivos e de baixo grau (baixo risco) possuem uma SLD em dez anos acima de 90% (MARGULIS et al. 2009). Já pacientes com tumores de alto grau e invasivos (alto risco) possuem uma alta probabilidade de recorrência, progressão e morte pela doença.

O pico de incidência do CUTS ocorre por volta da sétima década de vida, e o diagnóstico é três vezes mais frequente na população masculina (SHARIAT et al. 2011). Vários fatores de risco ambientais estão associados ao desenvolvimento do CUTS, sendo o tabagismo o mais importante deles, aumentando o risco relativo de 2,5 a 7 vezes (CRIVELLI et al. 2014). Uma revisão sistemática publicada em 2014, que incluiu 29 artigos sobre o assunto, também mostrou o efeito prognóstico do tabagismo em pacientes com CUTS submetidos à NUR. Na maioria dos estudos, o tabagismo esteve associado à recorrência intravesical, recorrência metastática, SCE e SG (CRIVELLI et al. 2014). Da mesma forma, foi identificado um efeito benéfico da interrupção do tabagismo no prognóstico de pacientes com carcinoma urotelial.

Outro fator ambiental associado ao desenvolvimento de CUTS é a exposição ocupacional às aminas aromáticas (COLIN et al. 2009). Essas substâncias são encontradas frequentemente em indústrias químicas, petroquímicas, couro, tintas, borracha, plástico e indústria têxtil. O tempo médio de exposição necessário para o desenvolvimento da doença fica em torno de sete anos.

A fenacetina é um analgésico comprovadamente associado ao risco de CUTS (COLIN et al. 2009). Como seu uso tem diminuído desde a década de 1970 após sua proibição, o aparecimento de tumores associados a esta substância praticamente desapareceu.

Um fator de risco associado ao desenvolvimento de CUTS é a exposição ao carcinógeno chamado ácido aristolóquico, encontrado na planta *Aristolochia Fangchi*. Esse carcinógeno é responsável pela Nefropatia Endêmica dos Balcãs e pela Nefropatia da Erva Chinesa, muito comum em áreas rurais da Sérvia, Croácia, Bósnia, Bulgária e Romênia. O ácido aristolóquico causa uma mutação no códon 139 do gene p53, levando ao desenvolvimento do CUTS (GROLLMAN et al. 2007; COLIN et al. 2009).

Em Taiwan, a exposição ao arsênico proveniente de água contaminada pode estar associada ao aumento na incidência de CUTS nessa região (CHIOU et al. 2001).

O CUTS hereditário ocorre em 10-20% dos casos (80-90% são esporádicos) e geralmente está associado ao carcinoma colorretal hereditário não polipóide (Síndrome de Lynch ou HNPCC). Em pacientes com essa síndrome, a chance de desenvolver CUTS pode chegar a 28% (BARROW et al. 2013). A Síndrome de Lynch é uma doença genética autossômica dominante causada pela mutação de

quatro genes de reparo, o MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Essas mutações causam um acúmulo de erros no DNA nas células em replicação, principalmente em regiões microssatélites, aumentando o risco de desenvolvimento de algumas neoplasias. O diagnóstico da Síndrome de Lynch é feito baseado em critérios clínicos, análise de tecido tumoral e avaliação genética. A suspeita da correlação entre o CUTS e a Síndrome de Lynch pode ser feita quando um paciente apresenta o diagnóstico de neoplasia urotelial com idade inferior a 60 anos, possui histórico pessoal de câncer de cólon ou carcinoma endometrial, ou possui histórico familiar de CUTS, câncer de cólon com idade inferior a 60 anos ou câncer endometrial (MORK et al. 2015).

1.2.2 Histologia, Classificação e Estadiamento

A histologia urotelial é a mais comum encontrada nos pacientes diagnosticados com CUTS, correspondendo a mais de 90% dos casos. Carcinoma de células escamosas representa menos de 10% dos casos e geralmente está associado à inflamação crônica e processos infecciosos secundários à presença de cálculos urinários (RINK et al. 2012). Apesar da histologia não urotelial pura ser relativamente rara, a presença de variantes histológicas em carcinomas uroteliais de trato superior pode ser encontrada em até 25% dos casos. RINK et al. (2012) publicaram um estudo colaborativo que estudou as diversas variantes histológicas em CUTS e seu impacto no prognóstico desses pacientes. Os autores descreveram que o carcinoma urotelial com diferenciação de células escamosas foi a variante mais comum encontrada, podendo ocorrer em até 9,9% dos casos, seguida pela diferenciação glandular em 4% dos casos. Outras variantes menos frequentes encontradas foram a sarcomatoide, micropapilífera, pequenas células e, por último e

menos frequente, a plasmocitoide. Pacientes que apresentaram variantes histológicas estavam mais propensos a ser diagnosticados com tumores de alto grau e com estágio patológico mais avançado e apresentaram maior chance de recorrência e morte pela doença, se comparados aos tumores uroteliais puros.

A classificação dos carcinomas uroteliais de trato urinário superior é semelhante à classificação dos tumores vesicais (BABJUK et al. 2011) e pode ser verificada a presença de tumores papilíferos não invasivos (tumores papilíferos uroteliais de baixo potencial de malignidade; carcinomas uroteliais papilíferos de baixo grau; e carcinomas uroteliais papilíferos de alto grau), lesões planas (carcinoma *in situ*) e carcinoma invasivo.

O estadiamento é realizado segundo a classificação TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) de 2009 (SOBIN et al. 2009). Os linfonodos regionais avaliados incluem linfonodos hilares, para-aórticos e paracavais nos casos de tumores de pelve renal e ureter proximal/médio; nos casos de tumores de ureter distal, os linfonodos pélvicos devem ser considerados (Anexo 2).

O grau tumoral é classificado segundo o sistema de graduação da *World Health Organization* 2004 (WHO 2004), pelo qual distinguem-se neoplasias de baixo potencial de malignidade, carcinomas de baixo grau e alto grau (LOPEZ-BELTRAN et al. 2004).

1.2.3 Diagnóstico

O sintoma mais comum em pacientes com diagnóstico de CUTS é a hematúria micro ou macroscópica, que ocorre em cerca de 80% dos casos, seguida por dor lombar em 20 a 40% dos casos e massa palpável em 10 a 20% dos casos

(RAMAN et al. 2011b). Sintomas sistêmicos, como perda ponderal, fadiga ou febre, são menos frequentes, mas devem levantar a hipótese de doença metastática.

Em geral, pacientes com sintomas geniturinários são avaliados inicialmente com exames de imagem. O método de imagem mais comumente realizado nesses casos é a ultrassonografia de vias urinárias, entretanto, com uma acurácia relativamente baixa para diagnóstico principalmente nos casos de neoplasias de ureter. Dessa forma, pacientes com sintomas de hematúria devem ser submetidos à tomografia computadorizada de abdome e pelve com reconstrução urológica (urotomografia). Esta, por si só, tem uma alta acurácia para diagnóstico de CUTS, com uma sensibilidade de 67-100% e uma especificidade de 93-99% (FRITZ et al. 2006). FRITZ et al. (2006) publicaram um artigo demonstrando que a acurácia da urotomografia para prever o estadiamento nas neoplasias uroteliais de trato urinário alto chegou a 96% nos casos de estágio I e II, e a 66,6% para estágios III e IV. As lesões planas, ou seja, os carcinomas *in situ* (Cis), geralmente não são detectadas pelos exames de imagem, a menos que exerçam um efeito de massa ou causem um espessamento na parede urotelial (XU et al. 2010). A ressonância magnética pode ser utilizada em casos específicos, para os quais existe contraindicação para realização da tomografia computadorizada, já que sua acurácia é inferior à urotomografia para diagnóstico de CUTS (TAKAHASHI et al. 2010).

A cistoscopia deve sempre ser realizada ao diagnóstico pelo risco de lesão vesical sincrônica em até 17% dos casos (COSENTINO et al. 2013). A citologia urinária deve ser realizada conjuntamente com a cistoscopia, porém sua sensibilidade para diagnóstico de CUTS é inferior se comparada à citologia para CUB, mesmo para lesões de alto grau. Dessa forma, a coleta de urina deve ser realizada *in situ*,

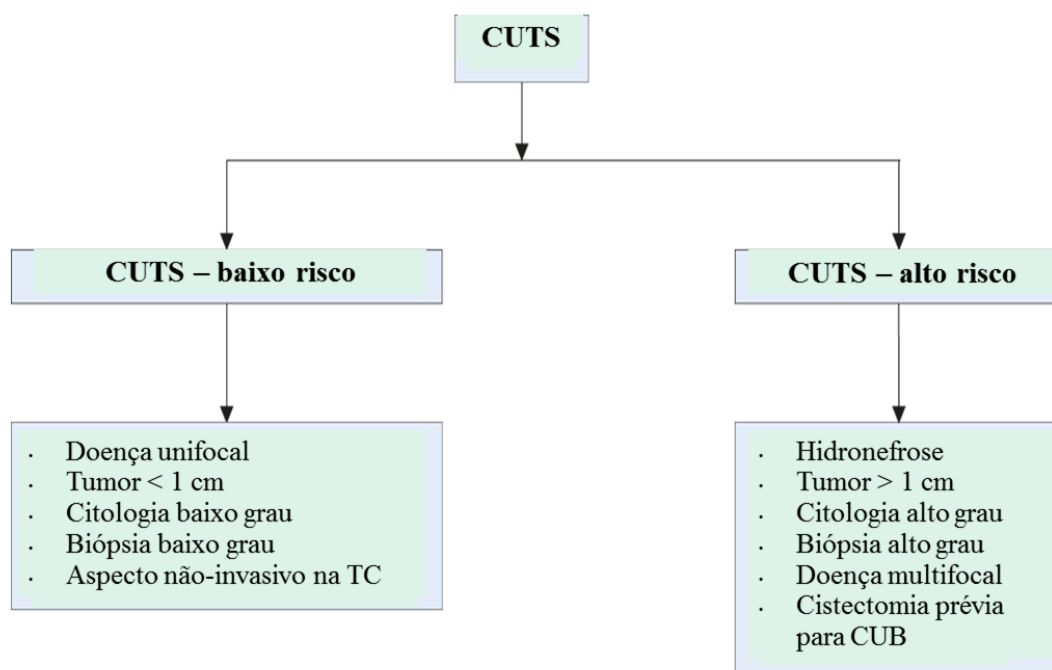
com retirada de material para amostra diretamente das cavidades pielocaliciais (MESSER et al. 2011). Apesar da baixa sensibilidade, a citologia tem uma alta especificidade para CUTS. Uma citologia urinária positiva pode ainda melhorar o estadiamento clínico de pacientes com diagnóstico de CUTS, pois geralmente está associada a tumores músculo-invasivos ou localmente avançados (BRIEN et al. 2010).

A ureterosopia flexível é utilizada para visualização de todo o sistema ureteropielocalicial. Ela permite a identificação do aspecto da lesão tumoral (sésil *versus* papilífero), assim como a realização de uma biópsia tanto para diagnóstico definitivo quanto para a determinação do grau da lesão (baixo *versus* alto grau) (ROJAS et al. 2013). Devido à dificuldade de ressecção em profundidade em CUTS, o grau tumoral na biópsia pode ser utilizado para correlação com o estadiamento tumoral, ou seja, lesões de baixo grau são não músculo-invasivas em mais de 70% dos casos. Ao contrário, lesões de alto grau são não músculo-invasivas em apenas 33% dos casos (BROWN et al. 2007). A ureterosopia é indicada principalmente quando há incerteza no diagnóstico após o exame de imagem, em casos de rim único, quando o tratamento conservador é considerado ou quando a ureterosopia com biópsia fornecerá informações adicionais que podem impactar na tomada de decisões terapêuticas (BRIEN et al. 2010; ROJAS et al. 2013).

1.2.4 Estratificação de risco

Devido à dificuldade de se realizar o estadiamento clínico tumoral de CUTS no pré-operatório (devido à localização da lesão, dificuldade de acesso, limitações dos exames de imagem), as diretrizes da Associação Européia de Urologia

(ROUPRÊT et al. 2015) propuseram uma estratificação de risco (Figura 1). O objetivo é utilizar diversas informações clínicas e estratificar pacientes em baixo risco (mais propensos a realizar tratamento conservador) e alto risco (mais propensos a realizar tratamento radical e/ou multimodal).



Fonte: Adaptado de ROUPRÊT et al. (2015).

Figura 1 - Estratificação de risco pré-intervenção em pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de pelve renal e ureter.

1.2.5 Tratamento

1.2.5.1 Doença localizada

O tratamento padrão para o CUTS localizado de alto risco é a nefroureterectomia radical com a retirada do *cuff* de bexiga, ou seja, a retirada de todo o rim envolto pela gordura perirrenal e fáscia de gerota, toda a extensão do

ureter e o trajeto intramural vesical do ureter distal, independentemente da localização da lesão (MARGULIS et al. 2009).

A ressecção do ureter distal e seu orifício é mandatória, porque existe um alto risco de recidiva tumoral nesta área, se não for tratada. Além disso, é difícil o seguimento dessa região com imagem ou endoscopia após a retirada do ureter proximal (ZIGEUNER e PUMMER 2008). Existem vários trabalhos que descrevem as diversas técnicas para abordagem do ureter distal (técnica aberta clássica extravesical ou transvesical, ressecção endoscópica do ureter distal ou técnica de *pluck*, técnica laparoscópica com ou sem utilização de grampeadores e a intussuscepção ou técnica de *stripping*) (LI et al. 2010; PHÉ et al. 2011). Aparentemente, a técnica de intussuscepção está associada a uma maior chance de recidiva vesical e locorregional e não deve ser utilizada (PHÉ et al. 2011). As outras técnicas não parecem ser oncollogicamente inferiores à técnica aberta clássica para retirada do ureter distal, porém, ainda não há estudos prospectivos randomizados comparando a segurança e eficácia das diversas técnicas descritas. A minha preferência pessoal é a realização da ressecção endoscópica em casos de tumores de pelve renal e ureter proximal ou médio com posterior clipagem precoce do ureter em local distal à lesão. Já para casos de tumores localizados em ureter distal, indicamos a realização da ressecção por técnica aberta clássica.

A realização da nefroureterectomia radical pode ser feita por via aberta, laparoscópica e, mais recentemente, por via robótica. Ainda se discute a segurança da via laparoscópica e robótica para realização desse procedimento. Como o carcinoma urotelial é um tumor potencialmente agressivo com alta possibilidade de recorrência e implantação, a realização da cirurgia em um ambiente de alta pressão

ocasionada pelo uso do pneumoperitônio nas vias laparoscópica e robótica, assim como o relato de implante tumoral em portais de laparoscopia, poderiam dessa forma prejudicar o resultado oncológico (ONG et al. 2003). Entretanto, trabalhos publicados recentemente mostraram que a cirurgia laparoscópica é segura em mãos de cirurgiões experientes, conquanto que princípios oncológicos sejam estritamente seguidos (ROUPRÊT et al. 2009). FAVARETTO et al. publicaram artigo em 2010a, no qual foram comparados os resultados oncológicos de 162 pacientes com diagnóstico de CUTS submetidos à nefroureterectomia laparoscópica ou aberta. Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação à recorrência vesical, SLR e SCE após 23 meses de seguimento médio. Este artigo é utilizado como uma das referências para a indicação de cirurgia laparoscópica em pacientes com CUTS localizado pelas diretrizes da Associação Européia de Urologia (ROUPRÊT et al. 2015). Um único trabalho prospectivo randomizado publicado recentemente confirmou esses achados mostrando resultados oncológicos semelhantes entre as duas técnicas para tumores localizados (SIMONE et al. 2009a). Entretanto, esse mesmo trabalho mostrou um benefício da técnica aberta para tumores localmente avançados ($\geq$ pT3). Sendo assim, até que novas evidências surjam na literatura, tumores localmente avançados devem ser tratados preferencialmente com técnica aberta. Os dados em nefroureterectomia robótica ainda são preliminares, entretanto, estudos recentes mostraram resultados oncológicos satisfatórios (ABOUMOHAMED et al. 2015).

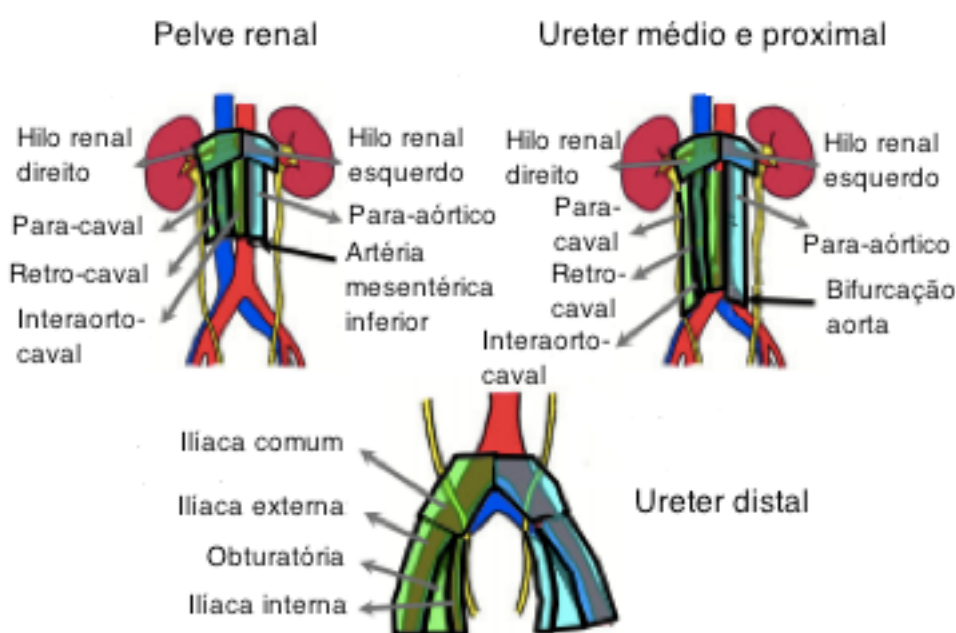
Uma característica do CUTS é a possibilidade de recidiva vesical após a NUR, que pode chegar a 47% em 5 anos (SEISEN et al. 2015). Dessa forma, pacientes submetidos à NUR devem ser acompanhados com cistoscopia

regularmente para detecção de recidivas vesicais. Dois estudos prospectivos e randomizados foram publicados e demonstraram uma diminuição no risco de recidiva vesical no primeiro ano após a NUR, com uso de Mitomicina C em dose única intravesical imediatamente após a cirurgia (O'BRIEN et al. 2011; ITO et al. 2013). Essa conduta é hoje indicada pelas diretrizes da Associação Européia de Urologia para todo paciente submetido à NUR (ROUPRÊT et al. 2015).

1.2.5.2 Linfadenectomia

A indicação de linfadenectomia em pacientes com CUTS, assim como os seus benefícios, ainda é controversa e muito discutida na literatura. Ao contrário do CUB, para o qual existem estudos com alto nível de evidência que demonstram os benefícios da linfadenectomia tanto no estadiamento quanto no tratamento desses doentes, ainda não há estudos prospectivos randomizados que demonstram esses benefícios em CUTS (VIEWEG et al. 1999; BRUINS et al. 2014). Apesar da falta de estudos com nível de evidência I, vários trabalhos retrospectivos e poucos prospectivos não randomizados publicados nos últimos dez anos sugerem benefícios de sobrevida na indicação da linfadenectomia regional em pacientes com doença músculo-invasiva (pT2 ou >) e de alto grau e, principalmente, em casos de tumores localmente avançados (pT3 ou >; N+) (KONDO et al. 2007b; KONDO et al. 2011; NCCN 2017). A probabilidade de acometimento linfonodal aumenta na medida em que aumenta o estadiamento tumoral, sendo que pacientes com estágio pT1 apresentam apenas 2,2% de risco de acometimento linfonodal, enquanto pacientes com estágio pT2-4 apresentam risco de 20% a 40% de acometimento linfonodal (LUGHEZZANI et al. 2010). KONDO et al. (2007b, 2011 e 2014) publicaram

diversos artigos sobre linfadenectomia em CUTS, propondo áreas mais abrangentes para retirada dos linfonodos (linfadenectomia estendida – Figura 2), a depender da localização da lesão (pelve renal *versus* ureter proximal/médio *versus* ureter distal), sendo o impacto na sobrevida dos pacientes maior do que o número de linfonodos retirados.



Fonte: Adaptado de KONDO et al. (2011).

Figura 2 - Linfadenectomia pélvica e retroperitoneal estendida proposta para pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial de pelve renal e ureter.

1.2.5.3 Quimioterapia perioperatória

Os benefícios da quimioterapia perioperatória baseada em cisplatina já foram demonstrados em pacientes com CUB músculo-invasivos e localmente avançados. Nesses casos, os pacientes apresentam benefícios relevantes de sobrevida, principalmente quando a quimioterapia é administrada antes da cirurgia

(neoadjuvante), com taxas de resposta completa de 20% e diminuição no risco de morte de 16% (International Collaboration of Trialists et al. 2011).

Nos casos de CUTS, os estudos apresentam baixo nível de evidência científica, porém, também mostram benefícios de sobrevida câncer-específica tanto em quimioterapia neoadjuvante quanto adjuvante, principalmente para pacientes com doença localmente avançada, conquanto que se use terapia baseada em cisplatina (LEOW et al. 2014). Uma peculiaridade nos casos de CUTS é a perda de função renal que os pacientes experimentam após a cirurgia radical. Kaag et al. publicaram estudo mostrando que apenas 19% dos pacientes com diagnóstico de CUTS e submetidos à NUR possuíam função renal suficiente para tratamento com cisplatina no pós-operatório (KAAG et al. 2010). Kaag e Favaretto publicaram estudo em 2014 analisando dados de 374 pacientes submetidos à NUR, que demonstrou uma queda média de 32% na função renal após o tratamento radical sem uma tendência de melhora ao longo do tempo (KAAG et al. 2014). Dessa forma, a quimioterapia neoadjuvante se mostra como melhor opção, principalmente devido à necessidade de uma função renal preservada para tratamento com cisplatina, a qual ainda é a droga de primeira escolha em pacientes com diagnóstico de carcinoma urotelial.

1.2.5.4 Tratamento conservador

O tratamento conservador pode ser indicado em casos bem selecionados de CUTS de baixo risco. Dessa forma, evita-se a perda completa do rim, as morbidades associadas com o tratamento radical e os riscos aumentados de insuficiência renal crônica (IRC) e, conseqüentemente, o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (MILLER et al. 2008). Estudos publicados nos últimos anos

comparando o tratamento radical com o tratamento conservador mostraram equivalência e segurança oncológica em casos específicos de pacientes com tumores únicos, papilíferos, pequenos (< 1 cm), não invasivos ($< pT2$) e de baixo grau (DANESHMAND et al. 2003; GADZINSKI et al. 2010). Assim sendo, o tratamento conservador deve sempre ser considerado mesmo em pacientes com rim contralateral normal, conquanto que sejam respeitados esses critérios de seleção. A indicação de tratamento conservador em pacientes com tumores de alto risco deve ser evitada devido às altas taxas de recorrência e progressão, assim como o impacto na sobrevida se o tratamento radical for postergado nesses pacientes (LUGHEZZANI et al. 2009). Entretanto, pode-se discutir a possibilidade do tratamento conservador em tumores de alto risco para casos imperativos (pacientes com rim único e IRC) (SEISEN et al. 2016).

O tratamento conservador pode ser feito por via endoscópica utilizando ureteroscopia flexível e ablação com laser, assim como através da ressecção segmentar e reimplante do ureter, a depender da localização da lesão (GADZINSKI et al. 2010; SILBERSTEIN et al. 2012). A biópsia deve sempre ser realizada antes do tratamento conservador para determinação do grau da lesão, assim como do aspecto e tamanho do tumor. A via anterógrada percutânea já foi muito utilizada no passado para ressecção de tumores pielocaliciais, porém, tem sido progressivamente abandonada devido ao surgimento de ureteroscópios flexíveis, que possibilitam o acesso a qualquer parte do trato urinário por via retrógrada (PALOU et al. 2004).

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS

Historicamente, os critérios utilizados como fatores prognósticos em pacientes portadores de CUTS são o estágio tumoral, o grau histológico de malignidade e o acometimento linfonodal (MARGULIS et al. 2009). Já que o CUTS é considerado um tumor relativamente raro, os trabalhos até então publicados são limitados devido a uma casuística muito pequena. Nos últimos anos, vários trabalhos foram publicados estudando os diversos fatores clínicos, operatórios, patológicos e moleculares em CUTS, que estavam diretamente relacionados com a evolução do paciente e a resposta ao tratamento. Isso foi possível devido ao surgimento de diversos grupos colaborativos entre centros do mundo inteiro, com casuística progressivamente crescente. Dessa forma, identificaram-se e descreveram-se os principais fatores prognósticos em CUTS, responsáveis por ajudar a selecionar a melhor abordagem terapêutica e estratégia de seguimento para um grupo relativamente heterogêneo de pacientes. Por questões didáticas, os fatores prognósticos foram assim divididos em quatro categorias: fatores pré-operatórios ou clínicos; fatores intraoperatórios ou cirúrgicos; fatores pós-operatórios ou patológicos; e marcadores moleculares (FAVARETTO et al. 2010b; SHARIAT et al. 2011; LUGHEZZANI et al. 2012). Utilizando alguns desses fatores prognósticos, autores desenvolveram nomogramas para predizer tanto agressividade tumoral quanto risco de recorrência e morte (BRIEN et al. 2010; JELDRES et al. 2010; MARGULIS et al. 2010; FAVARETTO et al. 2012;). A grande limitação desses nomogramas ainda é a acurácia preditiva e a falta de validação externa, o que limita a sua utilização na prática clínica.

1.3.1 Fatores pré-operatórios ou clínicos

Os fatores clínicos são aqueles relacionados ao paciente em si ou aqueles que podem ser identificados antes do tratamento definitivo, ou seja, através de exames de imagem ou endoscopia com biópsia.

Apesar da incidência de CUTS ser maior em homens, alguns trabalhos demonstraram que o sexo feminino possui taxas de sobrevida piores se comparadas com o sexo masculino (LUCCA et al. 2015). Entretanto, a influência do sexo no prognóstico de pacientes com CUTS ainda não é tão claro. Um estudo com quase 500 pacientes submetidos à NUR demonstrou que o sexo feminino foi um fator preditor de tumores localmente avançados (HUREL et al. 2015). LIU et al. (2013) conseguiram demonstrar que o sexo feminino esteve associado a um risco maior de morte pela doença, porém, apenas em pacientes com mais de 59 anos de idade. Já SHARIAT et al. (2011) analisaram mais de 700 pacientes com CUTS submetidos à NUR e não identificaram nenhuma correlação entre o sexo feminino e a presença de histopatologia mais agressiva ou piores taxas de sobrevida, quando comparadas ao sexo masculino.

Utilizando a base de dados da SEER, Lughezzani et al. observaram que a idade mais avançada em pacientes com CUTS foi um fator prognóstico independente para SCE, após controle de várias características clínicopatológicas (LUGHEZZANI et al. 2009). Esse resultado foi confirmado por um estudo multi-institucional com mais de 1.400 pacientes, publicado em 2010 por SHARIAT et al., no qual os mesmos conseguiram demonstrar o papel prognóstico independente da idade, sendo que pacientes com idade mais avançada (> 80 anos) estavam associados a uma menor SCE e SG. Os autores justificaram esse achado através da provável mudança no

potencial biológico do tumor com a idade, sendo que foram encontrados tumores mais agressivos em pacientes mais idosos; uma diminuição na atividade do sistema imunológico com a idade; e mudanças no padrão de tratamento em pacientes mais idosos (maior relutância em indicar tratamento mais agressivo em pacientes idosos), sendo que pacientes com mais de 70 anos receberam menos indicação de linfadenectomia e quimioterapia adjuvante.

O *Performance Status* dos pacientes, medido através do *ECOG-PS* (do inglês *Eastern Cooperative Oncology Group*), faz parte integral da avaliação do paciente com CUTS, e parece estar associado com uma maior mortalidade perioperatória e piores taxas de SG (MARTINEZ-SALAMANCA et al. 2012).

Já os estudos que analisam o papel prognóstico da obesidade em CUTS ainda são escassos com resultados preliminares. Um trabalho multi-institucional publicado em 2011 demonstrou que pacientes com índice de massa corporal (IMC) acima de 30 tiveram maiores chances de recidiva tumoral e morte pela doença (EHDAIE et al. 2011). Isso pode ser explicado devido ao processo de inflamação sistêmica causada pelo excesso de gordura corporal, ao aumento de alguns fatores associados com proliferação celular e apoptose, e a relação entre pacientes obesos e tumores com maior agressividade.

O tabagismo, por outro lado, além de ser considerado o principal fator de risco associado ao desenvolvimento de CUTS, parece ser um fator prognóstico importante. Uma revisão sistemática demonstrou que pacientes que ainda fumavam após o tratamento tiveram uma maior chance de recidiva vesical e metastática, e uma menor taxa de SCE e SG (CRIVELLI et al. 2014). Este estudo também identificou

um efeito benéfico no prognóstico desses pacientes com a interrupção do tabagismo ao diagnóstico.

É sabido que sintomas locorregionais, como hematúria, são relativamente frequentes em pacientes com diagnóstico de CUTS, podendo ocorrer em quase 80% dos casos. Entretanto, sintomas sistêmicos (como perda de peso, febre, anorexia e dor) são relativamente raros e geralmente denotam uma doença mais avançada. RAMAN et al. (2011b) identificaram uma correlação entre a presença de sintomas sistêmicos em pacientes diagnosticados com CUTS aparentemente localizados no estadiamento inicial com a presença de tumores mais agressivos na análise patológica após a NUR. Além do mais, foram identificadas piores SCE e SLR em pacientes com sintomas sistêmicos, o que levanta a possibilidade de esses pacientes já apresentarem doença micrometastática ao diagnóstico. Pacientes com sintomas locorregionais não apresentaram pior prognóstico se comparados aos pacientes com diagnóstico incidental ou assintomáticos.

Pacientes com diagnóstico de CUTS e que apresentam histórico prévio ou sincrônico de CUB apresentam taxas piores de SLR e SCE (MULLERAD et al. 2004). Já pacientes com CUB músculo-invasivo, que são submetidos à cistectomia radical e apresentam envolvimento ureteral pela doença, apresentam risco aumentado de recidiva em trato urinário alto no seguimento (TRAN et al. 2008). Dessa forma, pacientes com CUTS e histórico de CUB devem ser considerados para tratamentos mais agressivos, devido ao risco maior de recidiva e morte pela doença.

A urotomografia é o exame de imagem mais indicado tanto para diagnóstico quanto para estadiamento do CUTS. Vários estudos demonstraram a correlação entre a presença de hidronefrose no exame de imagem pré-operatório com a presença de

tumores mais agressivos, estadiamento patológico mais avançado e piores taxas de SCE e SLR (BRIEN et al. 2010; NG et al. 2011). Da mesma forma, a localização tumoral no exame de imagem (tumor de ureter *versus* tumor de pelve renal) também já foi muito discutida como fator prognóstico no CUTS. Entretanto, os trabalhos têm demonstrado resultados divergentes. PARK et al. demonstraram que tumores com localização ureteral, principalmente em pacientes com doença em estágio pT3, evoluíram com piores taxas de sobrevida, quando comparados com tumores de pelve renal (PARK et al. 2009). Os autores levantaram a hipótese de um papel protetor do parênquima renal em tumores pT3 de pelve renal. Esses resultados foram confirmados por um estudo multi-institucional com mais de 600 pacientes (OUZZANE et al. 2011). Por outro lado, várias publicações incluindo estudos populacionais e multi-institucionais não demonstraram o impacto prognóstico independente da localização tumoral na sobrevida desses pacientes (ISBARN et al. 2009; RAMAN et al. 2010). FAVARETTO et al. publicaram um artigo com mais de 300 pacientes demonstrando que, quando são controlados vários parâmetros clínico-patológicos entre os pacientes com tumores de pelve renal *versus* tumores de ureter, não é possível identificar uma diferença estatisticamente significativa nas curvas de sobrevida entre os grupos estudados (FAVARETTO et al. 2010b). Dessa forma, pode-se concluir que a literatura disponível atualmente não nos permite uma conclusão definitiva sobre o real papel da localização tumoral como fator prognóstico em CUTS. Entretanto, evidências sugerem que quando comparados pacientes com estádios tumorais semelhantes, os efeitos da localização tumoral como fator prognóstico independente acabam se perdendo.

A avaliação endoscópica associada à biópsia tumoral determina o diagnóstico definitivo do CUTS. Além disso, a determinação do grau na biópsia pode ajudar a definir o estágio patológico e prever o risco de doença invasiva ou localmente avançada. Diferentemente do CUB, o estágio clínico do CUTS é relativamente difícil de ser realizado, pois biópsias da camada muscular não são possíveis devido, principalmente, à espessura fina da musculatura e à instrumentação delicada da ureterosopia. BROWN et al. (2007) identificaram um valor preditivo positivo de 66% para prever tumores músculo-invasivos ($\geq pT2$) em pacientes com biópsias de alto grau. Já BRIEN et al. (2010) combinaram as informações do grau da biópsia com a citologia urinária e a presença de hidronefrose no exame de imagem e conseguiram um valor preditivo positivo para prever tumores músculo-invasivos de 89%. Dessa forma, o grau tumoral na biópsia fornece uma informação importante para prever tumores invasivos e, assim, realizar a correta estratificação de risco e ajudar na tomada de decisões em pacientes com CUTS.

1.3.2 Fatores intraoperatórios ou cirúrgicos

Os fatores intraoperatórios ou cirúrgicos se referem às características inerentes ao tratamento cirúrgico radical.

O intervalo entre o diagnóstico e o tratamento cirúrgico radical já foi descrito como um fator prognóstico independente em pacientes com CUB submetidos à cistectomia radical (GORE et al. 2009). WALDERT et al. (2010) investigaram o impacto prognóstico do intervalo entre diagnóstico e tratamento em pacientes com CUTS. Os autores conseguiram demonstrar que pacientes com um intervalo mais longo (> 3 meses) entre diagnóstico e tratamento estiveram associados a

características patológicas mais agressivas (estádio patológico mais avançado, tumores de alto grau histológico, invasão linfovascular) e a menores taxas de SLR e SCE. Esses resultados não foram confirmados por outros estudos, porém, na falta de melhores evidências, deve-se considerar o tratamento desses pacientes o mais rápido possível após o diagnóstico.

A técnica com a qual se realiza o tratamento radical também já foi muito discutida como fator prognóstico em CUTS. A nefroureterectomia radical aberta com a retirada do *cuff* de bexiga é considerada o tratamento padrão-ouro no tratamento do CUTS. Entretanto, a técnica laparoscópica tem surgido nos últimos anos como uma alternativa à técnica aberta, com vantagens inerentes ao procedimento minimamente invasivo, tais como menor sangramento, menor tempo de hospitalização, menor uso de analgésicos, recuperação mais rápida e melhores resultados estéticos. Vários trabalhos retrospectivos mostraram equivalência oncológica entre as técnicas aberta e laparoscópica (CAPITANIO et al. 2009; FAVARETTO et al. 2010a; WALTON et al. 2011). SIMONE et al. (2009a) e colaboradores publicaram o único trabalho prospectivo e randomizado comparando as duas técnicas e confirmaram essa equivalência oncológica apenas para tumores localizados. Dessa forma, as diretrizes da Associação Européia de Urologia indicam a realização de tratamento laparoscópico apenas para pacientes com doença órgão-confinada ($\leq$ pT2) e por equipe treinada em técnica minimamente invasiva, sendo que pacientes com tumores localmente avançados ($\geq$ pT3) devem ser prioritariamente operados por técnica aberta até que novas evidências apareçam.

Outro ponto importante na realização do tratamento cirúrgico radical é o manejo do ureter distal, ou seja, a forma como o *cuff* de bexiga é retirado. A excisão

do ureter distal e seu orifício é mandatória durante o tratamento do CUTS sendo que diferentes técnicas têm sido propostas na literatura, incluindo a técnica aberta clássica extravesical ou transvesical, ressecção endoscópica do ureter distal (técnica de *pluck*), técnica laparoscópica com ou sem utilização de grampeadores, e a intussuscepção ou técnica de *stripping* (PHÉ et al. 2011). Esta, por sua vez, apresentou um risco significativamente aumentado de recorrência vesical e locorregional quando comparada à técnica aberta (SAIKA et al. 2004). Já as demais técnicas descritas mostraram equivalência oncológica em relação à técnica aberta clássica, porém baseadas apenas em estudos retrospectivos.

As séries de nefroureterectomia radical mostram uma porcentagem relativamente baixa de pacientes submetidos à linfadenectomia (MARGULIS et al. 2009). Isso acontece devido às dúvidas que existem quanto aos benefícios que a linfadenectomia oferece aos pacientes com CUTS. Entretanto, diversos estudos publicados nos últimos anos mostraram que, pelo menos em pacientes com doença localmente avançada, a realização de linfadenectomia (pN0) esteve associada a melhores taxas de SCE e SLR, quando comparadas aos pacientes que não foram submetidos ao procedimento (pNx) (KONDO et al. 2007b; KONDO et al. 2011). Os mesmos autores recomendam áreas mais abrangentes para retirada dos linfonodos (linfadenectomia estendida), sendo o impacto na sobrevida dos pacientes maior do que o número de linfonodos retirados (KONDO et al. 2014).

1.3.3 Fatores pós-operatórios ou patológicos

Os fatores prognósticos pós-operatórios se relacionam às informações patológicas encontradas na avaliação da peça cirúrgica após a NUR.

O estadiamento tumoral patológico representa o fator com a maior acurácia pós-operatória para classificação prognóstica de pacientes com CUTS. Assim como identificado em outras neoplasias sólidas, quanto maior o estadiamento tumoral, pior é a evolução do paciente, sendo maior o potencial metastático da doença (MARGULIS et al. 2009). Diversos estudos foram publicados confirmando o potencial prognóstico do estágio tumoral em CUTS (NOVARA et al. 2007; BOLENZ et al. 2008; MARGULIS et al. 2009; PARK et al. 2009). De acordo com esses estudos, a SCE em cinco anos variou de > 90% em pacientes com estágio pTa e pT1 para menos de 20% em pacientes com estágio pT4. Dessa forma, o estágio tumoral representa o melhor fator prognóstico de sobrevida em pacientes com CUTS e deve sempre ser considerado na avaliação e aconselhamento desses pacientes.

Da mesma forma, o grau histológico tumoral representa também um fator prognóstico muito bem estabelecido em CUTS, pois ele está diretamente relacionado à agressividade e ao estadiamento tumoral. A última classificação utilizada pela WHO distingue três grupos de tumores: a neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial de malignidade, os carcinomas de baixo grau e os carcinomas de alto grau (LOPEZ-BELTRAN et al. 2004). Diversos estudos conseguiram validar o valor prognóstico dessa classificação (LI et al. 2009; MARGULIS et al. 2009). LI et al. (2009) mostraram que pacientes com tumores de baixo grau apresentam taxas de SCE em cinco anos ao redor de 70%. Já pacientes com tumores de alto grau possuem taxas menores que 40%. Dessa forma, o grau tumoral permanece como uma ferramenta importante na avaliação prognóstica dos pacientes com CUTS.

Completando os principais fatores prognósticos patológicos em CUTS, encontra-se o comprometimento linfonodal. A presença de invasão ou

comprometimento linfonodal é universalmente aceito como um importante fator prognóstico em neoplasias sólidas, pois indica a disseminação metastática do tumor para os linfonodos regionais. O risco de metástase linfonodal em CUTS depende basicamente do estadiamento tumoral, mas pode chegar a 40% em pacientes com estágio pT4. Vários estudos demonstraram o valor prognóstico independente da invasão linfonodal em CUTS (KONDO et al. 2007b; NOVARA et al. 2007; MARGULIS et al. 2009; ROSCIGNO et al. 2009; LUGHEZZANI et al. 2010). Todos esses estudos confirmaram o efeito deletério da invasão linfonodal na sobrevida desses pacientes, com taxas de SCE em cinco anos próximas de 30%.

Diversos outros fatores prognósticos patológicos foram descritos nos últimos anos. A presença de carcinoma *in situ* (CIS) no trato urinário alto é relativamente rara, mas geralmente está associada a uma chance maior de recorrência, principalmente vesical, e progressão da doença (PIERAS et al. 2010). Outros autores também identificaram a associação entre a presença de CIS e tumores com estadiamento mais avançado, assim como confirmaram o seu papel como um fator prognóstico independente para SCE e SLR (OTTO et al. 2011; YOUSSEF et al. 2011b).

A multifocalidade é definida como a presença de dois ou mais tumores em localização distinta no trato urinário alto, e sua incidência pode chegar a 24% dos casos (CHROMECKI et al. 2012). A presença de tumores multifocais foi confirmada por alguns estudos como sendo um fator prognóstico independente para recorrência tumoral, assim como SCE em pacientes com tumores localizados e submetidos à NUR (NOVARA et al. 2007; CHROMECKI et al. 2012).

A arquitetura tumoral representa as diferentes formas de invasão reportadas na análise patológica e pode significativamente afetar a sobrevida de pacientes com CUTS. A arquitetura tumoral pode ser descrita como tumores de aspecto sésseis ou tumores papilíferos. A primeira evidência da correlação entre a arquitetura tumoral e o prognóstico de pacientes com CUTS foi feita por LANGNER et al. (2006a). Esses resultados foram posteriormente confirmados por estudos multi-institucionais que demonstraram a correlação entre o padrão de invasão séssil com tumores mais agressivos (REMZI et al. 2009; FRITSCHKE et al. 2012). Da mesma forma, a arquitetura séssil foi um fator prognóstico independente de recorrência e SCE.

O tamanho tumoral é sabidamente um fator prognóstico bem estabelecido na evolução de pacientes em diversas neoplasias sólidas. Entretanto, os estudos sobre CUTS que avaliam o tamanho tumoral como fator prognóstico ainda são limitados, pois possuem casuística relativamente pequena. Esses autores observaram que pacientes com tumores > 3 cm possuíam uma chance significativamente maior de recorrência metastática e vesical da doença se comparados com pacientes com tumores < 3 cm (SIMONE et al. 2009b; PIERAS et al. 2010).

A invasão linfovascular (ILV) pelas células cancerígenas é uma etapa essencial para o processo de disseminação metastática da doença. Consequentemente, a presença de ILV na análise patológica pode ajudar a identificar pacientes com risco aumentado de comprometimento linfonodal, assim como uma chance maior de recorrência e morte pela doença após a NUR. Em CUTS, estudos multi-institucionais demonstraram que a ILV esteve associada à presença de tumores mais agressivos, como estágio patológico mais avançado, tumores de alto grau e presença de metástases linfonodais (KIKUCHI et al. 2009; NOVARA et al. 2010).

Além do mais, esses estudos confirmaram o valor prognóstico da ILV no sentido de prever o risco de recorrência e morte pela doença.

A presença de necrose tumoral é um fator preditor de agressividade em diversas neoplasias sólidas, incluindo carcinoma de células renais (FRANK et al. 2002). Em CUTS, autores demonstraram que a presença de necrose tumoral extensa (definida como $> 10\%$ da área tumoral com necrose) foi um fator prognóstico independente para SLR (LANGNER et al. 2006b). Esses resultados foram validados subsequentemente por diversos estudos, confirmando a associação da necrose tumoral extensa com características mais agressivas do tumor (estádio patológico mais avançado, alto grau, arquitetura séssil, ILV e metástases linfonodais), assim como o seu papel como fator prognóstico independente de SLR e SCE (LEE et al. 2007; SIMONE et al. 2009b; ZIGEUNER et al. 2010).

Finalmente, a presença de margens positivas após a NUR foi um fator prognóstico para recorrência vesical da doença em alguns estudos retrospectivos, porém, não esteve associada à SCE (BOLENZ et al. 2008; SEISEN et al. 2015). As taxas de margens positivas variam muito na literatura e podem chegar a 8%. Essa variação decorre estritamente das diversas técnicas descritas para manejo do ureter distal, o que impacta diretamente na presença das margens positivas após a NUR (SEISEN et al. 2015).

1.3.4 Nomogramas

Nomogramas são modelos matemáticos preditivos baseados em análises multivariadas. A integração de diversos fatores prognósticos nesses modelos

matemáticos tem como objetivo melhorar a acurácia preditiva e guiar a tomada de decisões em uma medicina de caráter personalizada.

Em CUTS, já foram publicados diversos nomogramas com os mais variados objetivos. Os nomogramas pré-operatórios têm o intuito de prever tumores músculo-invasivos e localmente avançados no sentido de indicar quimioterapia neoadjuvante ou linfadenectomia estendida no momento da NUR. Ao contrário, pode-se indicar a realização de terapia conservadora em casos de pacientes com suspeita de tumores de baixo grau e não invasivos.

BRIEN et al. (2010) utilizaram as informações de hidronefrose, citologia urinária e grau na biópsia e criaram um nomograma para prever tumores músculo-invasivos e localmente avançados com um valor preditivo positivo de 89% e 73%, respectivamente. E, ainda mais importante, quando as três variáveis eram negativas, o valor preditivo negativo chegou a impressionantes 100%. MARGULIS et al. (2010) descreveram um nomograma com as informações de arquitetura tumoral, grau na biópsia e localização tumoral conseguindo uma acurácia de 77% para prever tumores localmente avançados. Entretanto, a grande crítica foi a utilização da localização tumoral como fator preditivo, o que ainda é muito discutida e contraditória na literatura. Em 2012, FAVARETTO et al. criaram um nomograma pré-operatório utilizando informações pré-especificadas de imagem (hidronefrose e invasão tumoral) e ureterosopia (grau na biópsia e localização tumoral) com uma acurácia preditiva para tumores músculo-invasivos e localmente avançados de 71% e 70%, respectivamente (FAVARETTO et al. 2012). Apesar da identificação de uma melhora na acurácia preditiva quando foram adicionadas as informações de imagem nos modelos com apenas as variáveis da ureterosopia, o fato de a análise

multivariada não ter demonstrado uma associação estatisticamente significativa em relação à presença de hidronefrose e localização tumoral ureteral com tumores músculo-invasivos ou localmente avançados acabou impactando na acurácia preditiva do modelo final. Quando foram utilizadas apenas as informações de grau na biópsia e invasão no exame de imagem, que foram as variáveis independentemente associadas a tumores musculo-invasivos e localmente avançados, os autores conseguiram uma acurácia preditiva de 82% e 76%, respectivamente.

Já os modelos pós-operatórios têm o objetivo de identificar pacientes com risco aumentado de recidiva vesical, recidiva metastática e morte pela doença após o tratamento radical. Dessa forma, pode-se indicar a realização de quimioterapia adjuvante, alterar o calendário de seguimento de acordo com o risco de recidiva, assim como administrar terapias intravesicais para pacientes com risco aumentado de recidiva vesical. XYLINAS et al. (2014) publicaram um modelo utilizando informações clínicas (idade, sexo, histórico prévio de CUB), cirúrgicas (técnica cirúrgica e de manejo do ureter distal utilizada) e patológicas (localização tumoral, estágio tumoral, carcinoma *in situ* associado, acometimento linfonodal), e demonstraram uma acurácia de 69% para predizer risco de recorrência vesical em dois anos após a NUR. Já YOUSSEF et al. (2015) publicaram um modelo de estratificação de risco chamado de escore de TALL (T = estágio tumoral; A = arquitetura tumoral; L = invasão linfovascular; L = realização de linfadenectomia), com o objetivo de predizer risco de recorrência metastática e morte pela doença em cinco anos em pacientes diagnosticados com CUTS de alto grau após a cirurgia radical, atingindo uma acurácia preditiva de 73%. JELDRES et al. (2010) utilizaram a base de dados do SEER com quase 6.000 pacientes e criaram um nomograma pós-

operatório para prever risco de mortalidade câncer-específica em cinco anos utilizando as variáveis idade, estágio tumoral, acometimento linfonodal e grau tumoral, com uma acurácia preditiva de 75%.

O que podemos notar nesses modelos preditivos é que todos são provenientes de trabalhos retrospectivos com baixo nível de evidência, sendo que poucos foram validados externamente com diferentes populações. Apesar de alguns possuírem acurácia de quase 80%, ainda não são suficientes para guiar a tomada de decisões. Dessa forma, nenhum modelo preditivo ainda é recomendado para uso na prática clínica. A expectativa futura é a identificação de marcadores moleculares que possam ser incorporados em modelos matemáticos juntamente com informações clínicas, patológicas e cirúrgicas, com o intuito de melhorar a acurácia preditiva o suficiente para viabilizar a utilização desses modelos na prática diária.

1.3.5 Marcadores moleculares

Conforme descrito anteriormente, fatores clínicos, cirúrgicos e patológicos constituem importantes ferramentas para predição de desfechos clínicos e são utilizados em nomogramas prognósticos contendo pacientes portadores de CUTS. Entretanto, essas informações não levam em conta a variabilidade molecular dentro do tecido tumoral, o que poderia explicar a diversidade da evolução e desfechos clínicos nesse grupo de pacientes. Alguns autores vêm incorporando marcadores biomoleculares a modelos preditivos de sobrevida ou progressão da doença numa tentativa de aprimorá-los em carcinoma de células renais, câncer de próstata e, até mesmo, em CUTS (KLATTE et al. 2009; SVATEK et al. 2009; KIM et al. 2015). Porém, ainda carecemos de marcadores biomoleculares que apresentem impacto

prognóstico significativo e que sejam utilizados na prática clínica, principalmente em CUTS.

Alguns estudos foram publicados recentemente avaliando o impacto dos marcadores teciduais, sanguíneos, urinários e genéticos no prognóstico de pacientes com CUTS. Entretanto, por ser uma doença rara, existe um número limitado de artigos que analisam marcadores moleculares, sendo a maioria composta por estudos retrospectivos e com amostra pequena.

1.3.5.1 Marcadores sanguíneos

Marcadores sanguíneos já foram exaustivamente estudados em outras patologias. Em carcinoma de células renais, MOTZER et al. (1999) identificaram alguns fatores prognósticos sanguíneos (desidrogenase láctica, hemoglobina e cálcio sérico) e clínicos (KPS e ausência de nefrectomia prévia) para predizer sobrevida e criaram uma estratificação de risco em pacientes com doença renal metastática. Já em CUTS, poucos são os estudos que analisam marcadores sanguíneos como fatores prognósticos.

Autores demonstraram que a elevação de proteína C reativa sérica identificada no pré-operatório esteve associada à presença de tumores mais agressivos, assim como conseguiu predizer uma pior SLR e SCE em 130 pacientes com diagnóstico de CUTS e submetidos à NUR (SAITO et al. 2007). LEHMANN et al. (2007) estudaram fatores prognósticos em CUTS e identificaram que níveis elevados de leucócito sérico e fosfatase alcalina estiveram associados independentemente a uma pior SCE em 145 pacientes com carcinoma urotelial de ureter tratados por ureterectomia segmentar ou NUR. Recentemente, SHETH et al.

(2016) ao estudarem diversos marcadores sanguíneos em CUTS, confirmaram o valor prognóstico independente da fosfatase alcalina elevada em prever o risco de recorrência e morte pela doença após o tratamento radical em 101 pacientes. Os autores também identificaram que albumina sérica baixa esteve independentemente associada a piores taxas de SLR e SG. FUJITA et al. (2015) identificaram em um trabalho recente que as concentrações baixas de sódio e hemoglobina sérica identificadas no pré-operatório foram fatores prognósticos independentes para SCE em CUTS. Os autores criaram um modelo de estratificação de risco utilizando essas duas variáveis, o qual pode ajudar na tomada de decisões terapêuticas.

1.3.5.2 Marcadores urinários

A citologia urinária é um dos marcadores urinários mais utilizados em carcinoma urotelial. Possui uma alta sensibilidade e especificidade para tumores de alto grau, porém, sua aplicabilidade ainda é limitada para carcinomas de baixo grau. A citologia urinária para avaliação de CUTS geralmente possui uma sensibilidade inferior se comparada aos tumores vesicais, sendo dessa forma sua coleta indicada *in situ*, ou seja, diretamente das cavidades pielocaliciais (MESSER et al. 2011). Citologia urinária positiva é altamente sugestiva de CUTS quando não há sinais de lesões suspeitas em bexiga (incluindo carcinoma *in situ*) ou uretra prostática. Alguns estudos avaliaram a citologia urinária como fator prognóstico em CUTS. BRIEN et al. (2010) criaram um nomograma utilizando informações de exames de imagem, grau da biópsia e citologia urinária para prever risco de doença músculo-invasiva e não órgão-confinada em CUTS. Pacientes com citologia urinária positiva,

hidronefroze no exame de imagem e alto grau na biópsia possuíam um valor preditivo positivo para tumores músculo-invasivos de 89%.

A hibridização fluorescente *in situ*, mais conhecida como FISH, é um teste citogenético utilizado para detectar anormalidades moleculares que estão associadas a alguns tipos de neoplasias. Essa técnica tem sido utilizada nos exames de urina cada vez mais para detectar alterações associadas ao carcinoma urotelial. Em CUTS, estudos avaliaram a utilidade do FISH para diagnóstico, assim como acompanhamento de pacientes tratados de forma conservadora (CHEN et al. 2008). A sensibilidade para diagnóstico de CUTS foi de 52% em uma amostra com 43 pacientes. A limitação do estudo foi a grande quantidade de lesões de baixo grau, o que acarretou uma sensibilidade mais baixa do FISH, porém, melhor que a sensibilidade da citologia urinária (26%). Estudos mais recentes mostraram uma alta sensibilidade do FISH para diagnóstico de CUTS quando comparado à citologia urinária, porém, com uma especificidade menor (MIAN et al. 2010; REYNOLDS et al. 2014). A sensibilidade do teste de FISH foi ainda melhor quando combinada com a citologia urinária para detecção de tumores tanto invasivos como não invasivos (XU et al. 2011). A limitação da utilização do FISH descrita nesses estudos ainda é a alta taxa de falso-positivo, o que limita sua utilização no seguimento de pacientes tratados conservadoramente, sendo que a maior utilidade é no valor preditivo negativo (REYNOLDS et al. 2014).

1.3.5.3 Marcadores genéticos

A identificação das alterações genéticas associadas com CUTS evoluiu após a descoberta da relação entre a Síndrome de Lynch (Câncer Colorretal Hereditário Não

Polipoide ou HNPCC) e o risco de desenvolver CUTS. Estudos longitudinais em famílias de pacientes com HNPCC mostraram uma incidência aumentada de 14-22 vezes de CUTS, se comparada com a população geral (SIJMONS et al. 1998). A assinatura genética do HNPCC é a presença de instabilidade microssatélite (MIS), definida como a presença de mutações em sequências de DNA microssatélite, secundária à inativação ou mutação epigenética do sistema de reparo de DNA. As proteínas do sistema de reparo mais comumente mutadas na Síndrome de Lynch são a MSH2, MLH1, MSH6 e PMS2 (VILAR et al. 2010; BARROW et al. 2013). A presença de MSI tem sido demonstrada em pacientes com CUTS, entretanto, poucos estudos avaliaram a MSI como um fator prognóstico em CUTS. ROUPRÊT et al. (2005) analisaram 80 pacientes com CUTS e identificaram uma alta MIS e perda de MSH2 em 17% e 26% dos casos, respectivamente. A alta MIS foi um fator prognóstico independente na análise multivariada associada a uma melhor SG, especialmente em pacientes com idade inferior a 71 anos.

A metilação de DNA é um processo que altera a atividade de um segmento do DNA sem alterar a sua sequência, também chamado de processo epigenético. Quando localizado em um gene promotor, a metilação de DNA tipicamente atua para reprimir a transcrição genética. Esse processo, chamado de hipermetilação de gene promotor, está associado ao desenvolvimento e progressão de diversos tipos de neoplasias (VOGELSTEIN et al. 2013). CATTO et al. (2005) demonstraram que a hipermetilação estava presente em 86% de 280 pacientes diagnosticados com carcinoma urotelial (116 = CUB e 194 = CUTS), sendo a hipermetilação mais frequente em pacientes com CUTS. Os autores também identificaram que a hipermetilação estava associada a tumores com estágio mais avançado. Na análise

multivariada, a hipermetilação foi um fator prognóstico independente para progressão da doença.

1.3.5.4 Marcadores teciduais

A maioria dos estudos que avaliam o prognóstico dos marcadores moleculares em CUTS foi feita com marcadores teciduais, relacionados aos diversos processos celulares, como regulação do ciclo celular, crescimento, proliferação e diferenciação celular, angiogênese, apoptose, sinalização e adesão celular. Investigadores têm centralizado seus esforços no sentido de identificar marcadores associados a tumores agressivos, assim como relacionados ao prognóstico de pacientes com CUTS.

O p53 é um gene supressor tumoral envolvido no processo de regulação do ciclo celular e é um dos marcadores moleculares mais investigados em CUTS. REY et al. (1997) foram uns dos primeiros a avaliar o papel da expressão do p53 em pacientes com CUTS. Os autores identificaram uma associação entre a hiperexpressão imuno-histoquímica de p53 e tumores com características mais agressivas (estádio pT avançado, metástase linfonodal, invasão vascular e perineural), assim como uma associação com SG na análise multivariada. Esses resultados foram confirmados recentemente por uma Revisão Sistemática e Metanálise com mais de 500 pacientes (KU et al. 2013). Os autores confirmaram que a hiperexpressão de p53 esteve independentemente associado à SLR, SCE e SG.

As ciclinas são uma família de proteínas que regulam a progressão das células pelo ciclo celular através da ativação de quinases dependentes de ciclina. Estudos avaliaram a expressão de ciclina A e E como fator prognóstico em pacientes

com CUTS e não identificaram nenhuma relação entre a hiperexpressão dessas proteínas e a evolução desses pacientes (BOGDANOVIC et al. 2011; LIANG et al. 2012). P21 e p27 são considerados genes supressores tumorais e são membros da família das quinases dependentes de ciclina. Recentemente, autores conseguiram identificar uma associação entre a perda da expressão de p27 com a sobrevida global em uma pequena coorte de 34 pacientes diagnosticados com CUTS (SARSIK et al. 2016). Enquanto nenhum dos tumores não invasivos apresentou perda de p27, um terço dos tumores invasivos apresentou perda de p27 na avaliação imuno-histoquímica. Os mesmos autores não identificaram nenhuma associação entre a expressão de p21 e o prognóstico desses pacientes.

O Ki-67 é considerado uns dos mais promissores marcadores teciduais em CUTS. Ki-67 é uma proteína nuclear associada com a proliferação celular e é um excelente marcador para determinar a taxa de crescimento de uma determinada população celular. Em CUTS, estudos multi-institucionais publicados recentemente demonstraram que a hiperexpressão de Ki-67 esteve relacionada a características tumorais de alta agressividade (estádio pT avançado, invasão linfovascular, arquitetura tumoral séssil, necrose tumoral, carcinoma *in situ* concomitante e metástases linfonodais) (KRABBE et al. 2015). Na análise multivariada, a expressão de Ki-67 foi um fator prognóstico independente para SLR e SCE. Esses resultados foram também demonstrados em estudo prospectivo publicado em 2014 com 101 pacientes (KRABBE et al. 2014). Além do mais, alguns autores conseguiram identificar a utilidade da expressão tecidual de Ki-67 como um marcador de recorrência vesical em pacientes com CUTS tratados por NUR, podendo ser usado

para indicar instilação vesical precoce, assim como intensificar a vigilância com cistoscopias (JOUNG et al. 2008; LONG et al. 2016).

HER-2 (receptor de fator de crescimento epidermal 2 ou EGFR-2), também conhecido como ErbB2, é um membro da família de receptores de membrana de tirosina quinase que estão diretamente associados ao crescimento e desenvolvimento celular. A hiperexpressão de HER-2 já foi bem descrita em alguns tipos agressivos de câncer de mama, o que leva à ativação da via PI3K/AKT, e está associada à recorrência tumoral e pior sobrevida (MITRI et al. 2012). Terapias com anticorpos monoclonais mostraram melhora de sobrevida em pacientes com câncer de mama e hiperexpressão de HER-2. Em CUTS, estudos relativamente pequenos mostraram a relação entre a hiperexpressão de HER-2 e características patológicas agressivas, como estágio pT avançado, alto grau histológico e metástases linfonodais (LANGNER et al. 2005; VERSHASSELT-CRINQUETTE et al. 2012). Estudo multi-institucional publicado recentemente confirmou esses achados, além de identificar a associação entre a hiperexpressão de HER-2 e piores taxas de SLR, SCE e SG, mesmo após controle com outras variáveis na análise multivariada (SORIA et al. 2016). Assim como na avaliação do Ki-67, um estudo retrospectivo em centro único com 171 pacientes conseguiu identificar uma associação entre a hiperexpressão de HER-2 e o risco aumentado de recorrência vesical após a NUR, podendo ser assim utilizado como um marcador de recorrência tumoral na bexiga (SASAKI et al. 2014). Já a eficácia da terapia com anticorpos monoclonais em pacientes com CUTS e hiperexpressão de HER-2 ainda não foi testada em estudos bem desenhados.

EGFR (receptor de fator de crescimento epidermal), também conhecido como HER-1 ou ErbB1, também é um membro da família de receptores de membrana com atividade de tirosina quinase e está diretamente relacionado ao processo de crescimento, proliferação e diferenciação celular. Poucos estudos avaliaram a expressão de EGFR em CUTS. Eles identificaram uma associação entre a expressão de EGFR e tumores mais agressivos, como estágio pT avançado e alto grau histológico (TSAI et al. 2005; LEIBL et al. 2008). Um único estudo publicado por LONG et al. (2016) mostrou recentemente que a expressão positiva de EGFR esteve independentemente associada ao risco de recorrência vesical em 320 pacientes com CUTS após a NUR.

O fator nuclear- κ B (NF- κ B) é considerado uma proteína complexa envolvida no controle da proliferação celular. YEH et al. (2010) foram uns dos únicos a publicar um artigo avaliando o NF- κ B como fator prognóstico em CUTS. Os autores identificaram hiperexpressão citoplasmática e nuclear do NF- κ B em 61% e 27% dos pacientes, respectivamente. Apesar de eles não encontrarem nenhuma associação entre a expressão do NF- κ B com características tumorais agressivas, o NF- κ B foi considerado um fator prognóstico independente para SCE e SG.

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos teciduais e é considerada essencial para iniciação e progressão de várias neoplasias malignas. Vários fatores angiogênicos já foram identificados e estudados, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), FGFR3 (receptor de fator de crescimento fibroblástico 3), HIF-1 (fator indutor de hipóxia-1), VASH-1 (vasoibina-1) e TSP-1 (trombospondina-1). Alguns foram descritos em pacientes com CUTS. NAKANISHI et al. (2005) analisaram a

expressão imuno-histoquímica de HIF-1 α em 127 pacientes com diagnóstico de CUTS submetidos à NUR. Eles identificaram uma hiperexpressão de HIF-1 α em 55% dos pacientes, a qual estava associada a tumores sésseis e de alto grau histológico. Na análise multivariada, os autores identificaram uma associação entre a hiperexpressão de HIF-1 α e piores taxas de SLR e SG.

MIYAZAKI et al. (2012) estudaram a expressão de VASH-1 em 171 pacientes com CUTS e descreveram uma associação entre a hiperexpressão desse marcador com estágio pT avançado e alto grau histológico. A hiperexpressão de VASH-1 também foi um fator prognóstico independente para SLR e SCE.

A trombospondina-1, ou TSP-1, é considerada um potente inibidor da angiogênese. Dessa forma, uma expressão mais baixa da TSP-1 esteve associada a tumores mais agressivos e com pior prognóstico em CUB (GODDARD et al. 2002). Em CUTS, um único estudo retrospectivo com 97 pacientes analisou a expressão de TSP-1 como fator prognóstico. Os autores identificaram que níveis baixos ou negativos da expressão de TSP-1 estiveram associados com tumores mais agressivos, como estágio pT avançado e alto grau histológico. Entretanto, a expressão de TSP-1 não esteve associada com a sobrevida desses pacientes na análise multivariada.

O FGFR3 é um gene que codifica a produção de uma proteína também chamada FGFR3. Essa proteína, que é parte de uma família de proteínas receptoras com atividade de tirosina quinase, está envolvida em diversos processos celulares, como angiogênese, regulação do crescimento e proliferação celular. Estudos em CUB mostraram que a expressão de FGFR3 está associada à presença de tumores menos agressivos e de bom prognóstico, ou seja, tumores geralmente não invasivos e de baixo grau (HERNÁNDEZ et al. 2006). Alguns estudos confirmaram também

esses achados em CUTS (BURGER et al. 2006; VAN OERS et al. 2009). Eles demonstraram que pacientes com expressão de FGFR3 estiveram associados a tumores de baixo grau e baixo estágio tumoral com impacto favorável na sobrevida. Dessa forma, esse marcador possui potencial para identificação de pacientes candidatos à terapia conservadora se esses resultados puderem ser confirmados em espécimes de biópsia.

As uroplaquinas (UPs) são um conjunto de proteínas transmembrana relacionadas especificamente à diferenciação de células uroteliais. A especificidade das UPs pelas células uroteliais levaram-nas a serem utilizadas como marcadores de diferenciação urotelial. OHTSUKA et al. (2006) descreveram a expressão imuno-histoquímica de UP-III em 71 espécimes cirúrgicos de pacientes diagnosticados com CUTS. Eles identificaram uma expressão positiva de UP-III em 75% dos tumores não músculo-invasivos e em 40% dos tumores músculo-invasivos, assim como em 65% e 33% dos tumores de baixo e alto grau, respectivamente. Na análise multivariada, a expressão negativa de UP-III esteve associada a uma SCE pior em comparação com os pacientes que apresentaram expressão positiva, sendo um forte fator prognóstico de sobrevida neste estudo.

Apoptose é um processo altamente regulado de morte celular programada. Ela pode ser ativada por vias intrínsecas ou extrínsecas que induzem morte celular através da ativação de proteases chamadas caspases. A inibição do processo de apoptose ou de suas vias pode resultar em tumorigênese, assim como em progressão de neoplasias malignas. Alguns marcadores de apoptose já foram identificados e estudados em CUTS. A survivina é uma proteína que inibe parcialmente o processo de apoptose através do bloqueio da atividade da caspase. Um estudo retrospectivo

multi-institucional publicado recentemente com 732 pacientes demonstrou quase 40% dos casos com alteração na expressão de survivina (MATHIEU et al. 2015). Esse grupo esteve associado com características tumorais mais agressivas, como estágio pT avançado, metástases linfonodais, invasão linfovascular, necrose tumoral e arquitetura tumoral séssil. Entretanto, na análise multivariada, a expressão de survivina não esteve independentemente associada à SLR ou SCE.

Bcl-2 também é uma proteína antiapoptótica que funciona bloqueando a atividade da caspase. Estudos que analisaram a expressão desses marcadores em CUB mostraram que a hiperexpressão de bcl-2 e a perda de expressão da caspase-3 estiveram associadas a tumores mais agressivos, assim como com recorrência tumoral e SCE (KARAM et al. 2007). JEONG et al. (2009) analisaram diversos marcadores relacionados à apoptose em 112 casos consecutivos de CUTS tratados cirurgicamente e identificaram que a perda de expressão de caspase-3 esteve associada a estágio patológico avançado e alto grau histológico. Os autores não identificaram nenhuma associação entre a perda de expressão de caspase-3 e piores taxas de SLR ou SCE. Além do mais, não houve nenhuma associação entre a hiperexpressão de bcl-2 com variáveis clínico-patológicas, assim como com piores taxas de sobrevida, tanto na análise univariada quanto multivariada.

A adesão celular é importante para manter a integridade e estabilidade tecidual e ocorre através da atividade de glicoproteínas transmembrana chamadas de caderinas, em cooperação com as cateninas. Esse processo mantém a integridade do citoesqueleto e a estabilidade da adesão celular. A diminuição ou perda da expressão de E-caderina, o aumento da expressão de N-caderina, vimentina e fibronectina, assim como a diminuição na expressão de cateninas, observados em vários tipos de

neoplasias malignas, geralmente estão associados à perda da estabilidade e aumento da motilidade celular, fazendo parte do processo de transição epitélio-mesênquima. Essas características estão associadas à aquisição de fenótipos mais agressivos, pelos quais as células ganham capacidade migratória, invasiva e metastática (JEANES et al. 2008).

Alguns marcadores de adesão celular já foram estudados em CUTS. Snail é considerado um fator de transcrição da transição epitélio-mesênquima que pode reprimir a E-caderina e, dessa forma, controlar o processo de progressão tumoral e metástase. KOSAKA et al. (2010) analisaram a expressão imuno-histoquímica de 150 pacientes com diagnóstico de CUTS e identificaram uma baixa expressão nuclear de Snail em tumores não músculo-invasivos. Por outro lado, uma forte expressão de Snail foi identificada em pacientes com doença músculo-invasiva, e a expressão de Snail esteve significativamente associada a tumores com estágio pT avançado, alto grau histológico e invasão linfovascular. Na análise multivariada, a expressão aumentada de Snail foi um fator prognóstico independente para SLR e SCE.

Poucos estudos foram publicados analisando o papel das cateninas em CUTS, e os resultados ainda são considerados preliminares. IZQUIERDO et al. (2009) analisaram a expressão imuno-histoquímica de α , β e γ -catenina em 70 pacientes com CUTS. Os autores identificaram que apenas a perda da expressão de β -catenina esteve independentemente associada à SLR e SCE. Mais recentemente, REIS et al. (2012) publicaram artigo estudando um pequeno grupo de 20 pacientes com CUTS. Os autores identificaram uma pior taxa de SLR em pacientes com moderada

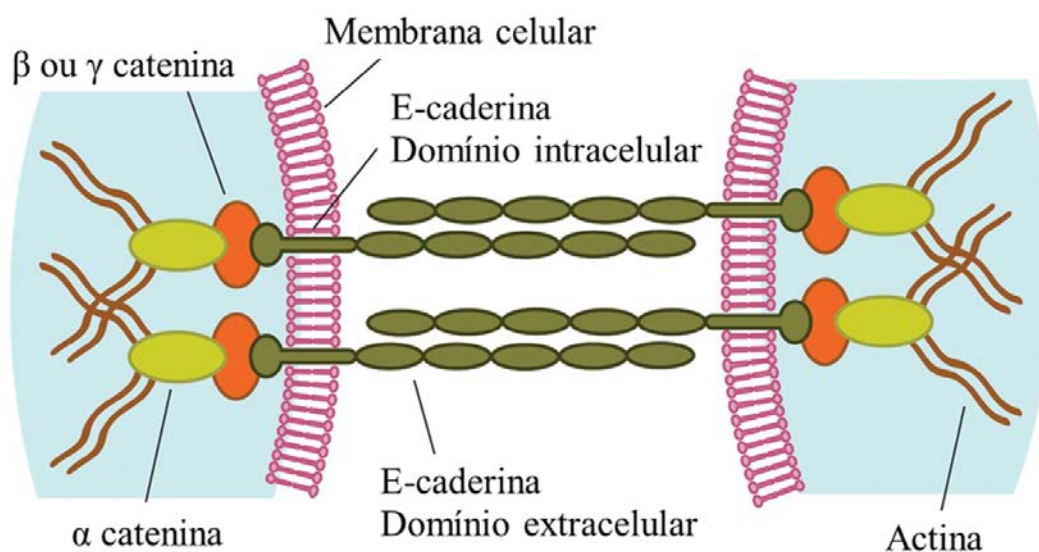
expressão de γ -catenina, porém, tal diferença não atingiu significância estatística. Não houve associação entre a expressão de α e β -catenina e recorrência tumoral.

As metaloproteinases (MMPs) são proteases capazes de degradar proteínas da matriz extracelular. O processo de invasão celular e metástase são dependentes do processo de destruição proteolítica dos componentes da matriz. Dessa forma, diversos estudos têm analisado o efeito da expressão das MMPs no processo de invasão e progressão neoplásica (TALVENSAARI-MATTILA et al. 1988; LOKESHWAR et al. 1993). Em CUTS, autores inicialmente identificaram uma associação entre a expressão de MMP-2 e estágio tumoral avançado (NAKANISHI et al. 2000; MIYATA et al. 2004). Posteriormente, em estudo retrospectivo com 69 pacientes, KAMIJIMA et al. (2005) não conseguiram validar esses resultados e não identificaram nenhuma associação entre a expressão de MMP-2 e MMP-9 com características clínico-patológicas ou sobrevida em CUTS. Por outro lado, estudo publicado recentemente com 340 pacientes diagnosticados com CUTS mostrou uma associação entre a expressão de MMP-11 com estágio pT avançado, metástases linfonodais, alto grau histológico, invasão vascular e perineural (LI et al. 2016). Na análise multivariada, a expressão de MMP-11 esteve independentemente associada à SCE e recorrência metastática.

1.3.5.5 As caderinas

As caderinas são uma família de glicoproteínas transmembrana dependentes de cálcio e responsáveis pela adesão célula-célula através de domínios extracelulares, conectando com o citoesqueleto de actina através da cooperação com proteínas citoplasmáticas chamadas cateninas. Células epiteliais e mesenquimais em tecidos

normais expressam E-caderinas e N-caderinas, respectivamente. Os domínios citoplasmáticos de E-caderina se ligam com subunidades β - e γ - das cateninas que, por sua vez, asseguram a conectividade com os miofilamentos de actina através das α -cateninas (Figura 3). Esse processo mantém a integridade do citoesqueleto e a estabilidade da adesão celular. Logo, a diminuição ou perda da expressão da E-caderina, observada em vários tipos de tumores malignos, resulta na perda da estabilidade e aumento na motilidade celular tecidual, estando associada consequentemente à aquisição de fenótipos mais agressivos. Essa é uma característica da transição epitélio-mesênquima (TEM) em neoplasias epiteliais (JEANES et al. 2008; WHEELLOCK et al. 2008).



Fonte: Adaptado de PERRY et al. (2010)

Figura 3 - E-caderina e o processo de aderência celular.

A transição epitélio-mesênquima é um processo pelo qual as células perdem as suas características epiteliais e ganham capacidade migratória, invasiva e

metastática, própria das células mesenquimais (Figura 4). A TEM é considerada um passo primordial no desenvolvimento e progressão das neoplasias malignas sólidas. As células epiteliais expressam altos níveis de E-caderina e células mesenquimais expressam N-caderina, fibronectina e vimentina. A diminuição na expressão da E-caderina é considerada um evento fundamental na TEM. Com a diminuição na expressão de E-caderina, as β -cateninas são liberadas no citoplasma e migram para o núcleo, onde podem ativar a expressão de fatores de transcrição indutores da TEM. Dessa forma, a diminuição na expressão de E-caderina é um gatilho para a progressão tumoral, resultando em tumores invasivos e pouco diferenciados (JEANES et al. 2008). Com a aquisição de características invasivas e migratórias, as células podem atingir a corrente sanguínea e metastatizar para outros órgãos. As células metastáticas, por sua vez, quando atingem o interior dos órgãos-alvo, necessitam restabelecer essas conexões intercelulares para sobreviverem nesse novo microambiente. Dessa forma, análise de células metastáticas mostrou uma reexpressão de E-caderina, um processo chamado de transição mesênquima-epitélio (WEINBERG et al. 2009).



Fonte: Adaptado de KIRTON (2010).

Figura 4 - O processo de transição epitélio-mesênquima.

O gene da E-caderina, chamado de CDH1, está localizado no cromossomo 16q22.1 e é considerado um gene supressor tumoral. Os mecanismos relacionados na perda ou inativação do gene da E-caderina não são completamente esclarecidos. RIBEIRO-FILHO et al. (2002) identificaram uma alta taxa de hipermetilação na região promotora em diferentes sítios CpG em amostras de carcinoma urotelial de bexiga, se comparadas com tecidos de bexiga normal. Diferentemente da via genética (mutações ou deleções, por exemplo), onde a supressão da transcrição de um gene ocorre de forma imediata e fixa, a hipermetilação se manifesta de forma gradual e progressiva, podendo até mesmo ser revertida. Esse processo de reversibilidade do fenômeno epigenético de hipermetilação pode, de certa forma, explicar a reexpressão de E-caderina identificada nas células de carcinomas uroteliais metastáticos no processo de transição mesênquima-epitelial (GRAFF et al. 2000; RIBEIRO-FILHO et al. 2002).

A diminuição na expressão da E-caderina como fator prognóstico já foi muito estudada em diversas neoplasias sólidas (JEANES et al. 2008; WHEELLOCK et al. 2008). Em CUB, diversos estudos confirmaram o valor da diminuição na expressão de E-caderina como fator prognóstico independente. Em 2007, autores analisaram a expressão imuno-histoquímica de E-caderina em 52 pacientes com diagnóstico de CUB e estágio pT1 de alto grau (ERDEMIR et al. 2007). Na análise multivariada, a diminuição na expressão de E-caderina foi um fator prognóstico independente para recorrência tumoral nesta casuística. Em pacientes com diagnóstico de carcinoma *in situ* de bexiga submetidos à cistectomia radical, a diminuição na expressão de E-caderina esteve independentemente associada tanto ao risco de recorrência tumoral quanto ao risco de progressão e morte pela doença (SHARIAT et al. 2001). MURAMAKI et al. (2010) analisaram a expressão de E-caderina e N-caderina em 115 pacientes diagnosticados com CUB não músculo-invasivo submetidos à ressecção endoscópica. Nesta casuística, a diminuição na expressão de E-caderina, assim como a expressão positiva de N-caderina, foram fatores prognósticos importantes para recorrência vesical após o tratamento endoscópico na análise multivariada.

Já em pacientes diagnosticados com CUTS, os estudos que analisaram o papel da diminuição na expressão da E-caderina como fator prognóstico tiveram resultados conflitantes. Alguns estudos conseguiram demonstrar a associação entre a diminuição na expressão de E-caderina com características tumorais biologicamente agressivas (NAKANISHI et al. 1997; STOJNEV et al. 2015). Em 1997, NAKANISHI et al. avaliaram uma coorte com 154 pacientes diagnosticados com CUTS e identificaram uma associação significativa entre a diminuição na expressão

de E-caderina com achados clínico-patológicos como estágio tumoral avançado, alto grau histológico e padrão de crescimento tumoral. STOJNEV et al. (2015) analisaram 106 pacientes com CUTS e, através de modelos de regressão logística, identificaram uma associação entre a diminuição na expressão de E-caderina e a presença de ILV. Nos modelos de análise multivariada, entretanto, esses trabalhos não conseguiram identificar uma associação entre a expressão de E-caderina com SLD ou SG.

Contrariamente, FROMONT et al. (2005) publicaram um trabalho que analisou um painel de diversos marcadores moleculares teciduais em 62 pacientes submetidos à NUR por CUTS e foram os primeiros a identificar uma associação entre a diminuição na expressão de E-caderina com SG e SLD na análise multivariada.

Poucos trabalhos foram publicados posteriormente, porém, nenhum conseguiu validar esses achados. Em 2011, MURAMAKI et al. ao estudarem 59 pacientes com CUTS, falharam em demonstrar a associação entre a diminuição na expressão de E-caderina com recorrência tumoral. Já REIS et al. (2012) ao analisarem apenas 20 espécimes de pacientes com CUTS localizado, tratados por NUR, identificaram uma associação, porém, entre a hiperexpressão de E-caderina e recorrência tumoral.

Como podemos notar, todos são trabalhos unicêntricos e com casuística pequena, apresentando baixo poder estatístico. Sendo assim, ainda se discute o real papel da expressão de E-caderina como fator prognóstico independente e sua associação com características patológicas agressivas em CUTS.

2 ARTIGO 1

2.1 TISSUE-BASED MOLECULAR MARKERS IN UPPER TRACT UROTHELIAL CARCINOMA AND ITS PROGNOSTIC IMPLICATIONS

Ricardo L. Favaretto ^a, Stenio C. Zequi ^a, Renato A. R. Oliveira ^a, Thiago Santana ^a,
Walter H. Costa ^a, Isabela W. Cunha ^b, Gustavo C. Guimaraes ^a

a Department of Pelvic Surgery, Urology Service, A. C. Camargo Cancer Center,
Sao Paulo, Brazil

b Department of Pathology, AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil

Key words: urothelium, carcinoma, recurrence, prognosis, survival, biomarkers,
molecular markers

Manuscript word count: 5,807

Abstract word count: 153

Corresponding author:

Ricardo L. Favaretto

Urology Service – Department of Pelvic Surgery

AC Camargo Cancer Center

Rua Antonio Prudente, 211

Sao Paulo – Brazil

Phone: +55 11 2189-5000 / Email: ricfavaretto@gmail.com

Abstract

Upper tract urothelial carcinoma (UTUC) is a rare and aggressive disease associated with high rates of recurrence and death. Radical nephroureterectomy (RNU) with excision of the bladder cuff is considered the standard of care for high risk UTUC while kidney-sparing techniques can be indicated for selected patients with low-risk disease. Clinical and pathological prognostic factors still represents a major deficiency in stratifying patients for treatment decisions. Incorporation of tissue-based molecular markers into prognostic tools could help to accurately stratify patients for clinical decision-making in this heterogeneous disease. Despite studies on tissue-based markers in UTUC have grown amazingly in the last few years, there are still many discrepancies between these studies results. Many of them are based on single centers and small cohorts with low level of evidence. However, evidence suggest that some biomarkers seem to be promising tools and more prospective multi-institutional studies validating the role of these markers are urgently awaited.

Introduction

Upper tract urothelial carcinoma (UTUC) is a rare disease accounting for approximately 5-10% of all urothelial malignancies and an estimated annual incidence of 2 per 100,000 inhabitants in Western countries.¹ Despite improvements in imaging and endoscopic techniques which led to a stage migration in UTUC, the disease still represents an aggressive malignancy with high recurrence and progression rates. Radical nephroureterectomy with excision of the bladder cuff (RNU) remains the gold standard of treatment for UTUC.^{1,2} However, kidney-sparing techniques can be indicated for selected patients with low-risk UTUC, while multimodal therapy

like perioperative chemotherapy and extended lymph node dissection in addition to RNU are considered for high-risk disease.^{1,2} The correct preoperatively identification of patients that could benefit from these procedures are still challenging. In the past two decades, various studies addressing clinical, operative and pathologic prognostic factors in UTUC were published.² Consequently, predictive and prognostic tools based on various statistical techniques have been developed in order to provide accurate estimates of outcomes.^{3,4,5} But predictive accuracy of these prognostic models is still inaccurate. So guiding patients and physicians in selecting the best treatment options and follow-up strategies in UTUC is still challenging and improvement of individual patient counseling is urgently needed. Recently published studies on prognostic biomarkers in urothelial carcinoma are promising and may improve outcomes by allowing for enhanced risk stratification and better decision-making.^{6,7,8}

Molecular markers are molecules produced by the tumor that are detectable and measurable in specimens that comprises tissue, blood or urine. Ideal biomarkers were supposed to have the ability to improve accuracy when integrated into current prognostic models allowing patient counseling regarding treatment decisions.⁹ Biomarkers are extensively studied in urothelial carcinoma of the bladder (UCB) where several molecular markers are well known independent prognostic factors associated with features of biologically and clinically aggressive UCB.^{10,11,12} However, evidence suggests that carcinogenetic mechanisms in UTUC are different from urothelial carcinoma of lower urinary tract and molecular alterations from one setting may not be extrapolated in the other.⁸ In the past few years, due to various collaboration groups, numerous studies have been published concerning molecular

markers as prognostic factors in UTUC, specially tissue-based markers.^{6,7,8} However, due to the rarity of the disease, there are no randomized controlled trials published so far. In addition, there are few review articles in the literature addressing this issue and none of them are dedicated specifically to tissue-based markers.

The objective of this review is to describe in detail the currently available data on tissue-based markers in UTUC, how each of these markers work in the oncogenesis process, their prognostic impact and how they might affect clinical decision-making in this disease.

Review Criteria

A non-systematic search in the literature was conducted using the PubMed/Medline database in order to identify English literature articles (original, review and editorial articles) regarding tissue-based molecular markers in upper tract urothelial carcinoma (UTUC). Specific keywords combinations for article retrieval were: “upper urinary tract carcinoma” or “upper tract transitional cell carcinoma” or “upper tract urothelial carcinoma” AND “molecular markers” or “biomarkers”. To select relevant articles for the different sections of the manuscript, additional references were collected by cross-referencing the bibliography of the selected articles. Authors choose articles published between 1995 and 2016 based on the fact that research on molecular markers in UTUC was available only in recent years. Older articles were considered only if relevant. The most relevant articles were examined and selected with the consensus of all authors.

Tissue-based markers in UTUC

A recent data presented by the Cancer Genome Atlas (TCGA) project have changed the landscape of urothelial carcinoma research.¹³ They provided a comprehensive genetic and molecular analysis with novel insights into several molecular pathways involving carcinogenesis, disease progression and possible targets to therapy. All these molecular markers involved in the tumorigenesis process can be measured and correlated with outcomes. In UTUC, most of the studies regarding molecular markers are related to tissue-based markers (Table 1 and 2). Many of the regulatory proteins involved in cell cycle regulation, cell growth, proliferation and differentiation, signal transduction, angiogenesis, apoptosis and cell adhesion have been recently studied in UTUC. The major limitations of these studies were their retrospective nature and their small sample size, mainly due to the rarity of the disease.

Cell cycle regulation

p53

The p53 gene is a tumor suppressor gene located at chromosome 17p13 and has the role of conserving genomic stability by preventing genome mutation. When p53 gene is somehow damaged, tumor suppression is severely compromised and tumors might form.

The p53 is one of the most widely investigated molecular markers in urothelial carcinoma. Several papers have been published concerning p53 expression and its role on outcomes in patients with UTUC. Most of the studies agreed that p53 expression is associated with features of aggressive disease like higher tumor grade

and stage. The problem is the independent prognostic value of p53 when adjusted for other clinical and pathological characteristics in the multivariate analysis. A Systematic Review and Meta-Analysis was recently published analyzing the role of p53 on survival of UTUC patients.¹⁴ Seven articles were identified that met the eligibility criteria for the systematic review, which included 514 patients. They found that overexpression of p53 was associated with statistically significant differences in disease-free (DFS), cancer-specific (CSS) and overall survival (OS), suggesting that p53 might be an independent prognostic factor in UTUC. Rey et al were one of the first to investigate the prognostic role of p53 and demonstrated that overexpression of p53 was significantly associated with tumor aggressiveness and patient survival in a small cohort of 83 patients.¹⁵

In contrary, Mitchell et al recently presented a review analyzing 24 papers published on the subject where multivariate analysis demonstrated that p53 expression was of independent prognostic significance in only five studies, all of which contained potential statistical bias. Authors concluded that the currently available data do not support a role for p53 as an independent prognostic marker in UTUC and more prospective collaborative studies are needed.¹⁶

Cyclins

Cyclins are a family of proteins that regulates the progression of cells through the cell cycle by activation of cyclin-dependent kinase (CDK). G1/S cyclins which includes cyclin A, cyclin D and cyclin E are essential for the control of the cell cycle at the G1/S transition. Cyclins expressions usually changes during the cell cycle and are strictly regulated. Overexpression of cyclin A and E and dysregulation

of CDK-cyclin complexes can promote tumor cell growth and plays an important role in pathogenesis of cancer. In addition, high expression of cyclin A and E are associated with poor prognosis in several types of cancer.¹⁷

In UTUC, Liang et al studied 340 patients with localized disease and found that expression of cyclin A was associated of worse metastasis-free survival (MFS) in univariate but not in the multivariate analyses.¹⁸ Bogdanovic et al retrospectively analyzed the expression of cyclin E in 24 patients and found no statistically significant association with tumor stage and grade.¹⁹

p21 and p27

P21 and p27 are members of the cyclin-dependent kinase family. They function as tumors suppressors and loss of its expression are associated with tumor development and progression in many malignancies.

In UTUC, Nakanishi et al found that expression of p27 protein decreased significantly with increase of stage and grade but no correlation was found between its expression and prognosis.²⁰ In 2005, Fromont et al analyzed a panel of molecular markers and found no prognostic value for p27 protein expression.²¹ Recently, Sarsik and col. studied the immunoexpression of p21 and p27 and correlated with various clinical and pathological variables as well as OS.²² They found that p21 and p27 are expressed in 52.9% and 88.2% of the cases, respectively. No correlation was found between lost or lower p21 expression and clinicopathological variables. However, loss or lower p27 expression were correlated with shorter OS in both univariate and multivariate analysis. None of the non-invasive tumors showed loss of p27 while a third of the invasive ones showed p27 loss. Authors declared that further research are

needed to assess the role of p27 in UTUC as this was a small cohort (n=34) and results are preliminary.

Cell growth, proliferation and signal transduction

Ki-67

Ki-67 is a nuclear protein associated with cellular proliferation and is an excellent marker to determine growth factor for a specific cell population. It has been proven to be of prognostic value for carcinomas of the prostate, breast and brain.

The prognostic value of Ki67 in UTUC has been studied in the last few years. A Japanese group retrospectively studied 69 patients diagnosed with UTUC and identified that immunohistochemistry overexpression of Ki67 was significantly correlated with stage, grade, lymphatic and vascular invasion.²³ In survival analyses, Ki67 expression was a significant prognostic factor in the univariate analysis, but did not reached significant impact on survival in the multivariate analysis. In 2005, a multicenter study analyzed the prognostic value of Ki67 in UTUC and found association with poor prognosis and disease recurrence only in univariate analysis.²¹

In contrast, more recently published study analyzing specimens from 107 patients submitted to RNU found that overexpression of Ki67 was associated with pathologic stage and grade.²⁴ Survival analyses demonstrated that overexpression of Ki67 was an independent predictor of DFS and CSS. These results were posteriorly confirmed by a prospective study with 101 patients.²⁵ Interestingly, Joung et al published a study where they tried to identify immunohistochemical predictors associated with bladder recurrence in patients with UTUC submitted to RNU and found that overexpression of Ki67 significantly predicts bladder cancer recurrence.²⁶

These results were recently confirmed by Long et al in a cohort of 320 patients.²⁷ So it could be used as a marker for bladder recurrence after RNU, anticipating intravesical therapies. In 2015, the International Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration published a multi-institutional validation study of the predictive value of Ki67 in patients with UTUC.²⁸ Immunohistochemical staining for Ki67 was performed on tissue microarray formed from 475 patients submitted to radical surgery. Overexpression of Ki67 was significantly associated with higher pT stage, lymphovascular invasion, sessile tumor architecture, tumor necrosis, concomitant carcinoma in situ and regional lymph node metastasis. On multivariate analysis, Ki67 was an independent predictor of DFS and CSS. Authors also described a statistically significant improvement in the Harrell's C-index when Ki67 was used in their preoperative and postoperative prediction models for DFS and CSS. Authors then concluded that Ki67 was validated as an independent predictor of outcomes in patients with UTUC.

HER-2

HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2), also known as ErbB2, is a member of the ErbB family of receptors. This family consists of four plasma membrane-bound receptor tyrosine kinases. HER-2 has been shown to play an important role in tumor cell growth and development. Amplification or overexpression of HER-2 stimulates the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/AKT pathway and is associated with the development and progression of certain aggressive types of cancer. In breast cancer, amplification of HER-2 can be found in almost 25-30% of the tumors and is associated with disease recurrence and poor

survival.²⁹ Targeting of HER-2 with monoclonal antibodies in over-expressing HER-2 breast carcinomas demonstrated improved survival and has become a standard treatment option.²⁹

Studies in urological tumors have shown that the frequency of overexpression of HER-2 in patients with UTUC submitted to radical therapy is a relatively rare event. Vershasselt-Crinquette et al assessed HER-2 expression in a cohort of 83 patients.³⁰ After immunohistochemical staining and in situ hybridization, overexpression and amplification was found in only 16% and 7%, respectively. However, patients with overexpression and amplification of HER-2 were more likely to have higher grade and stage diseases. Langner et al also described an infrequent HER-2 overexpression and amplification in UTUC patients but also more likely to occur in high-stage and high-grade tumors.³¹ The prognostic value of HER-2 concerning recurrence and survival in UTUC was controversial until larger studies were recently published. Sasaki et al published the largest HER-2 single-center study in UTUC patients.³² They investigated the HER-2 status in 171 UTUC patients submitted to RNU and found that overexpression and amplification of HER-2 was associated with early bladder cancer recurrence. These findings were recently validated by a large multicenter retrospective study with 732 patients in the cohort.³³ Soria and col. found that HER-2 was overexpressed in 35.6% of the patients and it was associated with pathologic characteristics such as more advanced T stage, presence of lymph node metastasis, high-grade tumor, tumor necrosis and lymphovascular invasion. On multivariable analysis, HER-2 overexpression remained associated with disease recurrence, overall and cancer-specific mortality.

Author concluded that HER-2 may represent a good marker for therapeutic risk stratification and potentially a target for therapy in some UTUC tumors.

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Epidermal growth factor receptor (EGFR), also known as HER-1 or ErbB1, is a transmembrane glycoprotein which has tyrosine kinase activity and is also a member of the ErbB family of receptors. The activation of EGFR stimulates its intrinsic intracellular protein-tyrosine kinase activity and initiates several signal transduction cascades, leading to DNA synthesis and cell proliferation. Mutations that lead to EGFR overexpression or upregulation have been associated with a number of cancers, including UCB.³⁴

Few studies have addressed the effect of EGFR on prognosis of patients diagnosed with UTUC. Tsai et al described in a small single-center study that ErbB1 expression was found in only 9.5% of UTUC tumors.³⁵ Leibl et al analyzed immunohistochemical expression of EGFR in 268 consecutive patients with UTUC submitted to RNU and correlated with histopathological parameters and patients outcomes.³⁶ Authors found that EGFR immunoreactivity was present in 55% of the cases, much higher than previous published studies. EGFR staining was associated with higher tumor stage and grade. In addition, EGFR staining intensity was associated with metastatic disease in univariate but not in the multivariate analysis. However, Long et al recently published study analyzing 320 UTUC patients and identified that EGFR positivity was an independent risk factor for bladder cancer recurrence after RNU.²⁷ So like Ki-67 and HER-2, EGFR expression could be used as a marker for bladder cancer recurrence after radical therapy.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B)

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) is a complex protein expressed in many cells and is widely used as regulator of genes that control cell proliferation and survival. Usually NF- κ B is inactive and sequestered in the cytoplasm by specific inhibitors during resting conditions. Several stimuli factors can activate and release NF- κ B which translocate to the nucleus. In the active form, it can regulate the expression of several genes associated with anti-apoptosis, inflammation, proliferation, invasion and angiogenesis.³⁷

A Chinese group studied the immunohistochemical expression of NF- κ B in 90 patients with UTUC.³⁸ They found cytoplasmic overexpression of NF- κ B in 61% of patients and nuclear immunoreactivity in almost 27% of patients. While no significant association of NF- κ B expression and pathological features of aggressive disease was seen, NF- κ B was an independent predictor factor for CSS and OS.

Angiogenesis

Angiogenesis is the process of new blood vessel formation in the tissue. This process is considered a critical event in the initiation and progression of various solid malignancies. Without angiogenic activity, solid tumors cannot grow and expand. Several angiogenic factors have been identified in the last years including vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3), vasohibin-1 (VASH1) and thrombospondin-1 (TSP-1). Despite being well studied in UCB, there are not many papers published so far concerning angiogenesis related markers in UTUC.

Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α)

The Hypoxia-Inducible Factor 1 protein (HIF-1) is considered a transcription factor and plays an important role in oxygen homeostasis. The levels of subunit HIF-1 α protein can increase rapidly due to response to hypoxia and up-regulates a number of factors important for tumor expansion. Thus, overexpression of HIF-1 α protein is associated with tumor aggressiveness and prognosis in several malignancies including UCB.³⁹

In UTUC, few studies have been published concerning HIF-1 α expression and outcomes. Nakanishi et al carried out a retrospective study analyzing 127 patients and found that 55% of samples had immunohistochemistry overexpression of HIF-1 α .⁴⁰ This overexpression was correlated with high grade and sessile tumors but it was not correlated with tumor stage. Authors also found that overexpression of HIF-1 α were associated with both OS and DFS rates in the univariate and multivariate analyses (in all tumors and in invasive tumors), inferring that HIF-1 α protein expression may provide information about prognosis in patients with UTUC.

Vasohibin-1 (VASH1)

Vasohibin-1 (VASH1) is a protein encoded by the VASH1 gene and is considered an angiogenic molecule specifically expressed in endothelial cells and upregulated by VEGF and fibroblast growth factor-2. VASH1 expression is restricted to endothelial cells of blood vessels in the tumor stroma.⁴¹

Miyazaki et al were the first to examine the immunohistochemical expression of VASH1 and microvessel density (MVD) in UTUC and correlated with outcomes.⁴² 171 patients were included in the analysis and a significant positive

correlation between MVD and VASH1 was found. Higher levels of VASH1 were significantly associated with higher pathological T stage and high-grade tumors. Multivariate analysis revealed that high VASH1 density was an independent predictor of tumor recurrence and CSS. Authors concluded that results are preliminary but VASH1 density seems to represent a clinically relevant predictor of patient prognosis in UTUC and could be proposed as a new biomarker, after external validation studies.

Thrombospondin-1 (TSP-1)

Thrombospondin-1 (TSP-1) is as a well-known potent inhibitor of angiogenesis in various physiological and pathological conditions and it works inhibiting proliferation of tube-like structures in endothelial cells.⁴³

Earlier studies described that TSP-1 expression was inversely related to microvessel density in bladder cancer patients.^{44,45} So these reports suggest that low TSP-1 expression might be correlated with increase malignant potential, aggressiveness and poorer outcomes in urothelial carcinomas. In UTUC, there is one paper published so far studying TSP-1 expression and its impact in patient's prognosis. It was a retrospective single-center study with 97 UTUC patients submitted to RNU.⁴⁶ Authors analyzed the expression of 4N1K, which is derived from the C-terminal domain of TSP-1 and its known to inhibits angiogenesis both *in vivo* and *in vitro* models.⁴⁷ Miyata and col. found that low or negative expression of 4N1K was associated with higher pathological T stage and high-grade tumors. Survival analyses demonstrated that negative expression of 4N1K was a predictor of

DFS and CSS in the univariate but not in the multivariate analyses. So based on these results, the prognostic value of TSP-1/4N1K is limited in UTUC.⁴⁶

Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)

Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) is part of a tyrosine kinase receptor family that regulates several cellular processes such as growth, differentiation and angiogenesis. In general, FGFR3 mutations are associated with low-risk tumors that rarely progress and usually have a good prognosis in bladder cancer patients.⁴⁸

In 2009, van Oers et al described that FGFR3 mutations occurred in the same frequency in UTUC and bladder tumors while they studied 280 patients (117 bladder tumors and 163 upper tract tumors) with a median follow up of 56 months.⁴⁹ They also stated that FGFR3 mutations were associated with low-stage tumors and better survival in patients with UTUC and UCB. Burger and col. found that FGFR3 mutation was associated with favourable stage and grade in 172 UTUC patients and also had a favourable impact on survival, as 24.1% vs. 54.2% cancer related deaths occurred in the mutated group.⁵⁰ Based on these results, FGFR3 has the potential to be used as a marker to identify low-risk patients. It could be used to select candidates for conservative therapies other than RNU, if these results could be reproducible in biopsy specimens.

Cell differentiation

Uroplakin

Uroplakins (UPs) comprise a group of 4 transmembrane proteins (UPs Ia, Ib, II, and III), which are specific differentiation products of urothelial cells and are

undetectable in nonurothelial tissues.⁵¹ They are usually present at the apical surface and cytoplasm of umbrella cells but absent in the intermediate and basal cells. The exclusive specificity of UPs for urothelial carcinoma had led to their use as markers for urothelial differentiation.

Ohtsuka et al evaluated the immunohistochemical expression of UPIII in surgical specimens of 71 patients diagnosed with UTUC and submitted to RNU.⁵² In all specimens there was intense UPIII immunoreactivity of umbrella cells of normal urothelium. In tumor samples, UPIII expression was positive in 75% of non-muscle invasive tumors and 40% of muscle-invasive disease. UPIII expression was also positive in 65% of grade 1-2 tumors and 33% of grade 3. The cancer-specific survival of patients with negative UPIII expression was significantly worse than those with positive UPIII expression; and multivariate analysis revealed that UPIII expression was a powerful predictor of CSS even better than stage and lymph node status. More recently published study found that UPII antibody had higher sensitivity than UPIII and can be used as a better marker even in challenging settings.⁵³

Cell adhesion and epithelial-mesenchymal transition (EMT)

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a process in which cells lose epithelial characteristics and gain migratory and invasive properties of mesenchymal cells. EMT is considered a key step in cancer development and progression. Epithelial cells express high levels of E-cadherin, whereas mesenchymal cells express N-cadherin, fibronectin and vimentin. Loss of E-cadherin is considered a fundamental event in EMT. Decreased expression of E-cadherin and increase of N-cadherin has been established as a feature of EMT in epithelial malignancies and has been shown

to be associated with the acquisition of aggressive phenotypes.⁵⁴ In normal cells, E-cadherins' cytoplasmic domain binds with subtypes β - or γ - of the catenin proteins, which in turn secure attachment to the actin microfilament, thus ensuring cytoskeleton integrity and stable cellular adhesion.⁵⁵ Loss of cellular adhesion is a tipping point in tumor progression resulting in poorly differentiated and invasive tumors.

Snail

Snail is considered a EMT transcription factor (TF) that can repress E-cadherin and therefore regulates tumor progression and metastasis. So Snail contributes to EMT in cell differentiation.^{8,56}

Kosaka et al analyzed 150 patients and demonstrated that nuclear Snail staining was very weak in non-muscle invasive UTUC.⁵⁶ In contrast, strong Snail staining was observed in many of the nucleus of muscle invasive tumors. Snail expression was significantly higher in the high tumor stage, high grade, and in tumors showing lymphovascular invasion. Multivariate regression analysis revealed that elevated Snail expression was a significant and an independent prognostic predictor for DFS and CSS.

Cadherins

In many studies of various solid malignancies, patients with decreased E-cadherin expression were most likely to harbor tumors with features of biologically aggressive disease. This association is in line with the biological role of E-cadherin, as a calcium-dependent glycoprotein essential to epithelial tissue integrity. Loss of

cellular adhesion results in the detachment of cancerous cells from the primary lesion, promoting invasiveness and metastasis.⁵⁷ However, studies that addressed the relationship between E-cadherin and outcomes in UTUC led to conflicting results.

Fromont et al showed in a cohort of 62 UTUC patients, that decreased E-cadherin expression was an independent prognostic factor for DFS and OS.²¹ Conversely, most of the studies published thereafter with larger cohorts failed to demonstrate independent association between E-cadherin expression and disease recurrence.^{58,59} Favaretto et al assessed the clinical significance of a decreased E-cadherin expression in an international cohort of 678 UTUC patients treated with RNU.⁶⁰ They found that decreased E-cadherin expression in tumor cells was associated with adverse clinico-pathological features. Results also confirmed that decreased E-cadherin expression was indeed associated with a higher probability of disease recurrence and cancer-specific mortality in UTUC. However, when adjusted for the effects of established prognostic factors in multivariable analysis, E-cadherin expression lost its independent prognostic value and, therefore, may have only limited value in clinical practice for prognostication. Although, it could be used to identify more aggressive tumors in the preoperative setting, in order to indicate perioperative chemotherapy and extended lymph node dissection in addition to RNU, if these results could be validated in biopsy specimens.

Muramaki et al addressed the role of N-cadherin expression in UTUC. 59 patients were analyzed and N-cadherin expression was an independent prognostic factor of intra- and extravesical recurrence after RNU.⁵⁹ Authors didn't analyze predictors of cancer-specific survival in this cohort. More recently, Abufaraj et al analyzed N-cadherin expression in a multi-institutional study with more than 600

patients.⁶¹ Positive N-cadherin expression was identified in 43% of the patients and it was associated with features of aggressive disease (advanced tumor stage, lymph node metastases and sessile architecture) and disease recurrence but not CSS or OS in the univariate analysis. Again, after adjustment for the effects of available confounders, N-cadherin was not associated with any survival outcomes.

Catenins

Catenins are a family of proteins that are found in complexes with cadherin cell adhesion molecules. The primary mechanical role of catenins is connecting cadherins to actin filaments, specifically in the adhesion junctions of epithelial cells, which ensure cytoskeleton integrity and stable cellular adhesion.⁶² The catenins that were identified reported in human cancers became known as α -catenin, β -catenin and γ -catenin.

Usually studies addressing the prognostic value of catenins in urothelial carcinoma are analyzed together with cadherins expression as part of a combined panel of EMT markers.^{55,63} In UCB, Clairotte et al analyzed 101 patients with bladder cancer (71 T1 and 30 T2/T3 tumors) and described a highly significant correlation between the decreased expression of all catenins molecules and increased TNM stage.⁵⁵ Multivariate analysis revealed that only γ -catenin was an independent predictor of DFS in patients with stage T1 bladder urothelial tumors.

In UTUC, few studies addressed the expression of catenins as prognostic markers. Izquierdo et al. analyzed the immunohistochemical expression of α , β and γ -catenin of 70 tumors samples from UTUC patients and correlated with outcomes.⁶⁴ In the multivariate analysis, they found that abnormal expression of β -catenin was an

independent prognostic factor for tumor progression and cancer-specific survival. Reis et al with a small cohort of only 20 patients described that moderate expression of γ -catenin was correlated with a lower disease-free survival rate, but did not reached statistical significance.⁶³ There were no relationship between α -catenin and β -catenin expression with tumor recurrence. Additionally, authors found that lower α -catenin expression was associated with larger tumors. In conclusion, the data on catenins as prognostic markers in UTUC is still weak and none can be use at the moment for clinical-decision making.

Metalloproteinases

Matrix metalloproteinases (MMPs) are part of a large family of protease capable of degrading all kind of extracellular matrix proteins. Tumor cell invasion and metastasis are biologically dependent on the proteolytic destruction of surrounding matrix components. Therefore, a large number of studies are found to investigate the effect of MMPs expression in cancer invasion and progression.^{65,66,67}

In UTUC, Nakanishi et al first analyzed expression of Metalloproteinase-2 (MMP-2) and correlated with outcomes.⁶⁸ They found a relationship between MMP-2 expression and tumor stage. Also, in the univariate analysis, MMP-2 expression was associated with OS but did not reach statistical significance on multivariate analysis. Later, Miyata et al investigated MMP-2 and MMP-9 expression in 91 patients submitted to RNU.⁶⁹ The expression of MMP-2 and MMP-9 was associated with higher pT stage but was not independent predictor of CSS. In 2005, Kamijima et al studied 69 UTUC patients and did not find any correlation with MMP-2 and MMP-9 expression and high-risk disease.⁷⁰ Conversely, Li et al demonstrated that

high MMP-11 expression in 340 UTUC patients and 295 UCB patients was significantly associated with advanced pT status, nodal metastasis, high histological grade, vascular and perineural invasion, and frequent mitoses.⁷¹ In multivariate analyses, MMP-11 expression was independently associated with CSS and metastasis development. Based on the most recent available literature, expression of MMP-2 and MMP-9 are of limited value as predictive markers in UTUC. In the other hand, MMP-11 showed promising results in one large multi-center retrospective study and may serve as a novel prognostic and therapeutic target.

Apoptosis

Apoptosis is a highly regulated and controlled process of programmed cell death. It can be initiated by an intrinsic or extrinsic pathway and both pathways induce cell death by activating proteases called caspases. Inhibition of apoptosis process and pathways can result in tumorigenesis as well as cancer progression because they allow tumor cells to survive longer and resist to harmful stresses.⁷² Several markers of apoptosis has been identified and studied in several malignancies, including survivin, caspase-3, FAS (first apoptosis signal), bcl-2 and bax. Some of these markers were studied in UTUC and are summarized as follow.

Survivin

Survivin is a member of a family of proteins that partly inhibits apoptosis by blocking downstream caspace activity.⁷³ In 2009, a South Korean group published a study analyzing the expression of several apoptosis related markers in UTUC and their association with clinical and pathological features as well as disease recurrence

and survival.⁷⁴ They detected 20% of the patients with altered expression of survivin. There was no correlation of survivin expression and clinical or pathological characteristics. But in multivariate analysis, survivin expression was the only marker independently associated with disease recurrence and survival. Conversely, well designed studies with larger cohorts were not able to confirm these findings.^{75,76,21} Recently, Mathieu et al published a large multi-center study with 732 patients diagnosed with UTUC and analyzed survivin expression.⁷⁵ They found almost 40% of the tumors with altered survivin expression and associated with more advanced pathological tumor stages, lymph node metastases, lymphovascular invasion, tumor necrosis and tumor architecture. In the univariate analysis, altered survivin was significantly associated with DFS and CSS but did not achieve independent predictive status on multivariate analysis.

Bcl-2 and caspase-3

Bcl-2 is an antiapoptotic protein which blocks caspase activation by inhibiting the mitochondrial release of cytochrome-c.⁷⁷ In UCB, studies on bcl-2 and caspase-3 are conflicting. More recently published studies showed that overexpression of bcl-2 and loss of caspase-3 expression were both associated with higher pathological stage, disease recurrence and cancer-specific mortality rates.⁷⁸ In the paper by Jeong et al, they analyzed several apoptosis-related markers in 112 consecutive UTUC patients.⁷⁴ They reported that 27% of patients had altered expression of bcl-2 and 24% of caspase-3. The lower expression of caspase-3 was associated with pathological tumor stage and grade. Bcl-2 was not associated with any clinicopathological parameters. In the survival analysis, altered expression of caspase-3 were

significantly associated with an increased probability of disease recurrence and CSS. When adjusted for the effects of pathologic features on multivariate analysis, caspase-3 did not reach statistical significance. Bcl-2 overexpression was not associated with disease recurrence or survival in univariate and multivariate analysis.

In 2013, Yoshimine et al published data on 175 patients with UTUC and analyzed the expression of bcl-xl, one of the bcl-2 family proteins.⁷⁹ They also tested the use of a specific inhibitor of bcl-xl, called bafilomycin A1(BMA), *in vitro* and in xenograft mouse models. Authors found that patients with a high expression of bcl-xl had significantly lower 5-year CSS rate (53%) than those with a low bcl-xl score (77%). Multivariate analysis indicated that a high bcl-xl expression was an independent prognostic factor for CSS. Additionally, BMA inhibited urothelial cell proliferation *in vitro* by induction of apoptosis and treatment of BMA significantly inhibited tumor growth in mouse models. Authors suggested that besides being a good marker for prognosis in UTUC patients, bcl-xl may be a promising therapeutic target strategy.

Conclusion

UTUC is a highly heterogeneous disease and clinical predictive factors still represents a major deficiency in accurately stratify patients for treatment decisions. Pathologic predictive factors may be more accurate to determine risk of aggressive disease but information is only available after definitive therapy, precluding the patients to receive more effective preoperative chemotherapy or extended lymph node dissection. Recent molecular studies have shed light into the different pathways of biological tumor behavior and carcinogenesis, and incorporation of tissue-based

markers into prognostic tools may help accurately identify patients who could benefit of intensified therapy and monitoring.

In this literature review, we described the currently available data on tissue-based markers in UTUC (Box 1), their prognostic impact and how they might affect clinical decision-making in this disease. Despite a growing body of evidence concerning tissue-based markers in UTUC in the last decades, none of these current biomarkers are actually used in daily practice. Studies on tissue-based markers have grown amazingly but there are still many discrepancies between these studies results. Most of them are based on single centers and small cohorts with low level of evidence. Few studies had their results validated and incorporation of tissue-based markers into prognostic models were not able to improve their accuracy significantly.²⁸

One other problem in studying tissue-based markers in UTUC is the heterogeneity of the cohort usually used in UTUC studies. Netto et al. described in a review article the two different pathogenetic pathways in UCB.⁸⁰ One was associated with non-muscle invasive bladder cancer and comprises disruption to the PI3K – AKT – mTOR pathway, alterations in the tyrosine kinase receptor gene FGFR3 and the oncogene HRAS. On the other hand, the main genetic alterations underlying muscle-invasive bladder cancer involved tumor suppressor genes encoding proteins that regulates cell cycle and apoptosis pathways, including TP53 and RB1. Studies on UCB usually comprises patients with non-muscle invasive disease submitted to transurethral resection and intravesical therapies or patients with muscle-invasive disease submitted to radical cystectomy. Differently, studies in UTUC usually

encompass patients with any stage or grade submitted to RNU, with probably too many different pathogenetic pathways in the same cohort.

However, some biomarkers seemed to be promising tools in UTUC. In large multi-institutional retrospective studies, Ki-67, HER-2, EGFR and N-cadherin were independent prognostic factors for bladder cancer recurrence after RNU, and could be used as a marker for intravesical therapies and bladder surveillance. Most of the tissue-based markers studied were associated with high grade/high stage diseases except for FGFR3 which was associated with low risk tumors. And others biomarkers showed enthusiastic results as independent prognostic factors for survival (p53, Ki-67, HER-2 and MMP 11).

All these studies in tissue-based markers have been performed in RNU specimens. It would therefore allow us to stratify patients for adjuvant chemotherapy, intravesical therapy or intensify surveillance. However, the preoperative identification of patients with aggressive disease versus low-risk disease for indication of neoadjuvant chemotherapy and extended lymph node dissection versus conservative therapy is still a critical issue. So the validation of these biomarkers in biopsy specimens would be of great value for treatment decision-making.

Recently immunologic check point markers as PD1/PDL-1, CD28, CTLA-4, T-cell receptors and proteins as FOXP3 have been evaluated as prognostic factors and as target for new drugs in multiple solid tumors, including UCB.⁸¹ So in the near future we hope the role of these new markers as prognostic factors will be investigated in UTUC.

In conclusion, tissue-based markers hold promise in improving clinical prediction of outcomes in UTUC and further developments are urgently needed. Prospective studies validating the role of these markers are awaited and for these purposes, multi-institutional collaborations are necessary. An innovative panel of combination of biomarkers covering a role pathway or even different pathways might be of great value, because of the dynamic process of tumorigenesis, invasion and progression. And creating accurate models to predict not even patients outcomes but response to therapy would be a great step towards improving survival.

References

- 1 Rouprêt, M. et al. European guidelines on upper tract urothelial carcinomas: 2013 update. *Eur Urol.* **63**, 1059-1071 (2013).
- 2 Lughezzani, G. et al. Prognostic factors in upper urinary tract urothelial carcinomas: a comprehensive review of the current literature. *Eur Urol.* **62**, 100-114 (2012).
- 3 Favaretto, R.L. et al. Combining imaging and ureteroscopy variables in a preoperative multivariable model for prediction of muscle-invasive and non-organ confined disease in patients with upper tract urothelial carcinoma. *BJU Int.* **109**, 77-82 (2012).
- 4 Jeldres, C. et al. Highly predictive survival nomogram after upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer.* **116**, 3774-84 (2010).
- 5 Margulis, V. et al. Preoperative multivariable prognostic model for prediction of nonorgan confined urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol.* **184**, 453-8 (2010).
- 6 Patel, N. et al. Molecular aspects of upper tract urothelial carcinoma. *Urol Oncol.* **32**, 28 e11-20 (2014).

- 7 Grivas, P.D., Melas, M. & Papavassiliou, A.G. The biological complexity of urothelial carcinoma: Insights into carcinogenesis, targets and biomarkers of response to therapeutic approaches. *Semin Cancer Biol.* **35**.125-32 (2015).
- 8 Yates, D.R. & Catto, J.W. Distinct patterns and behaviour of urothelial carcinoma with respect to anatomical location: how molecular biomarkers can augment clinico-pathological predictors in upper urinary tract tumours. *World J Urol.* **31**. 21-9 (2013).
- 9 Svatek, R.S. et al. Pre-treatment biomarker levels improve the accuracy of post-prostatectomy nomogram for prediction of biochemical recurrence. *Prostate.* **69**. 886-94 (2009).
- 10 Knowles, M.A. & Hurst, C.D. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer.* **15**. 25-41 (2015).
- 11 Sapre, N., Herle, P., Anderson, P.D., Corcoran, N.M. & Hovens, C.M. Molecular biomarkers for predicting outcomes in urothelial carcinoma of the bladder. *Pathology.* **46**. 274-82 (2014).
- 12 Xylinas, E. et al. Blood- and tissue-based biomarkers for prediction of outcomes in urothelial carcinoma of the bladder. *Urol Oncol.* **32**. 230-42 (2014).
- 13 Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature.* **507**. 315-22 (2014)
- 14 Ku, J.H. et al. The role of p53 on survival of upper urinary tract urothelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genitourin Cancer.* **11**. 221-8 (2013).
- 15 Rey, A., Lara, P.C., Redondo, E., Valdés, E. & Apolinario, R. Overexpression of p53 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. Relation to tumor proliferation and survival. *Cancer.* **79**. 2178-85 (1997).
- 16 Mitchell, S., Mayer, E. & Patel, A. Expression of p53 in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Nat Rev Urol.* **8**. 516-22 (2011).
- 17 Yasmeen, A., Berdel, W.E., Serve, H., & Müller-Tidow, C. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn.* **3**. 617-33 (2003).

- 18 Liang, P.I. et al. HuR cytoplasmic expression is associated with increased cyclin A expression and poor outcome with upper urinary tract urothelial carcinoma. *BMC Cancer*. **12**. 611 (2012).
- 19 Bogdanovic, L.J. et al. Immunohistochemical detection of cyclin E in transitional cell carcinoma. *J BUON*. **16**. 727-32 (2011).
- 20 Nakanishi, K., et al. Expression of p27(Kip1) protein in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Mod Pathol*. **14**. 371-6 (2001).
- 21 Fromont, G. et al. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Eur Urol*. **48**. 764-70 (2005).
- 22 Sarsik,B.et al. P21 and p27 Immunoexpression in Upper Urinary Tract Urothelial Carcinomas. *Pathol Oncol Res*. **22**. 839-845 (2016).
- 23 Kamijima, S. et al. The prognostic value of p53, Ki-67 and matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Int J Urol*. **12**. 941-7 (2005).
- 24 Jeon, H.G. et al. Expression of Ki-67 and COX-2 in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *Urology*. **76**. 513.e7-12 (2010).
- 25 Krabbe, L.M. et al. Prospective analysis of Ki-67 as an independent predictor of oncologic outcomes in patients with high grade upper tract urothelial carcinoma. *J Urol*. 191. 28-34. (2014).
- 26 Joung, J.Y. et al. Identification of immunohistochemical factors that predict the synchronous or metachronous development of bladder tumors in patients with upper urinary tract tumors. *Urol Int*. **81**. 306-11 (2008).
- 27 Long, X. et al. Epidermal Growth Factor Receptor and Ki-67 as Predictive Biomarkers Identify Patients Who Will Be More Sensitive to Intravesical Instillations for the Prevention of Bladder Cancer Recurrence after Radical Nephroureterectomy. *PLoS One*. **11**. e0166884 (2016).
- 28 Krabbe, L.M. et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 in patients with high grade urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol*. **193**. 1486-93 (2015).

- 29 Mitri, Z., Constantine, T. & O'Regan, R. "The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy". *Chemotherapy Research and Practice*. 743193 (2012).
- 30 Vershasselt-Crinquette, M. et al. Assessment of human epidermal growth factor receptor 2 status in urothelial carcinoma of the upper urinary tract: a study using dual-color in situ hybridization and immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. **20**. 363-6 (2012).
- 31 Langner, C. et al. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract transitional cell carcinoma: systematic analysis applying tissue microarray technique. *Urology*. **65**.176-80 (2005).
- 32 Sasaki, Y. et al. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract urothelial carcinoma-an analysis of 171 patients. *Int J Clin Exp Pathol*. **7**. 699-708 (2014).
- 33 Soria, F. et al. HER2 overexpression is associated with worse outcomes in patients with upper tract urothelial carcinoma (UTUC). *World J Urol*. [Epub ahead of print] (2016).
- 34 Lipponen, P. & Eskelinen M. Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer*. **69**.1120-5 (1994).
- 35 Tsai, Y.S., Tzai, T.S., Chow, N.H. & Wu, C.L. Frequency and clinicopathologic correlates of ErbB1, ErbB2, and ErbB3 immunoreactivity in urothelial tumors of upper urinary tract. *Urology*. 2005. **66**.1197-202 (2005).
- 36 Leibl, S. et al. EGFR expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease progression and metaplastic morphology. *APMIS*. 2008. **116**. 27-32 (2008).
- 37 Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell*. 2004. **6**. 203-8. Review (2004).
- 38 Yeh, H.C. et al. Nuclear factor- κ B activation predicts an unfavourable outcome in human upper urinary tract urothelial carcinoma. *BJU Int*. 2010. **106**. 1223-9 (2010).

- 39 Theodoropoulos, V.E. et al. Hypoxia-inducible factor1 α expression correlates with angiogenesis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *Eur Urol.* **46.** 200-8 (2004).
- 40 Nakanishi, K.et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α protein predicts survival in patients with transitional cellcarcinoma of the upper urinary tract. *Clin Cancer Res.* **11.** 2583-90 (2005).
- 41 Hosaka, T. et al. Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. *Am J Pathol.* **175.** 430-9 (2009).
- 42 Miyazaki, Y. et al. The prognostic significance of vasohibin-1 expressionin patients with upper urinary tract urothelialcarcinoma. *Clin Cancer Res.* **18.** 4145-53 (2012).
- 43 Tolsma, S.S., Stack, M.S. & Bouck, N. Lumen formation and other angiogenic activities of cultured capillary endothelial cells are inhibited by thrombospondin-1. *Microvasc Res.* **54.** 13-26 (1997).
- 44 Bochner, B.H. et al. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1995. **87.** 1603-12 (1995).
- 45 Goddard, J.C., Sutton, C.D., Jones, J.L., O'Byrne, K.J. & Kockelbergh, R.C. Reduced thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. *Eur Urol.* 2002. **42.** 464-8 (2002).
- 46 Miyata, Y., Watanabe, S., Kanetake, H. & Sakai, H. Thrombospondin-1-derived 4N1K peptide expression is negatively associated with malignant aggressiveness and prognosis in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *BMC Cancer.* **12.** 372 (2012).
- 47 Kanda, S., Shono, T., Tomasini-Johansson, B., Klint, P. & Saito, Y. Role of thrombospondin-1-derived peptide, 4N1K, in FGF-2-induced angiogenesis. *Exp Cell Res.* **252.** 262-72 (1999).
- 48 Hernández, S. et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelialbladder carcinomas. *J Clin Oncol.* **24.** 3664-71 (2006).
- 49 van Oers, J.M. et al. FGFR3 mutations indicate better survival in invasive upper urinary tract and bladder tumours. *Eur Urol.* 2009. **55.** 650-7 (2009).

- 50 Burger, M. et al. Mutation of the FGFR3 oncogene is an independent and favorable prognostic factor for tumor-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Verh Dtsch Ges Pathol.* **90.** 244-52 (2006).
- 51 Lobban, E.D. et al. Uroplakin gene expression by normal and neoplastic human urothelium. *Am J Pathol.* **153.** 1957-67 (1998).
- 52 Ohtsuka, Y. et al. Loss of uroplakin III expression is associated with a poor prognosis in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *BJU Inter.* **97.** 1322-6 (2006).
- 53 Smith, S.C. et al. Uroplakin II outperforms uroplakin III in diagnostically challenging settings. *Histopathology.* 2014. **65.** 132-8 (2014).
- 54 Jeanes, A., Gottardi, C.J. & Yap, A.S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene.* **27.** 6920-29 (2008).
- 55 Clairotte, A. et al. Expression of E-Cadherin and α -, β -, γ -Catenins in Patients with Bladder Cancer Identification of γ -Catenin as a New Prognostic Marker of Neoplastic Progression in T1 Superficial Urothelial Tumors. *American journal of clinical pathology.* **125.** 119-26 (2006).
- 56 Kosaka, T. et al. Expression of snail in upper urinary tract urothelial carcinoma: prognostic significance and implications for tumor invasion. *Clin Cancer Res.* **16.** 5814-23 (2010).
- 57 Frixen, U.H. et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology.* **113.** 173-85 (1991).
- 58 Nakanishi, K., Kawai, T., Torikata, C., Aurues, T. & Ikeda, T. E-cadherin expression in upper urinary tract carcinoma. *International journal of cancer.* **74.** 446-49 (1997).
- 59 Muramaki, M., Miyake, H., Terakawa, T., Kusuda, Y. & Fujisawa, M. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. *Urology.* **78.** 1443-e7 (2011).
- 60 Favaretto, R.L. et al. Prognostic role of decreased E-cadherin expression in patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study. *World J Urol.* [Epub ahead of print] (2016).

- 61 Abufaraj M et al. Prognostic role of expression of N-cadherin in patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study. *World J Urol.* [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00345-016-1968-2 (2016).
- 62 Hirohashi, S. & Kanai, Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* **94**. 575–81 (2003).
- 63 Reis, S.T. et al. Immune expression of E-cadherin and α , β and γ -Catenin adhesion molecules and prognosis for upper urinary tract urothelial carcinomas. *Int Braz J Urol.* **38**. 466-7 (2012).
- 64 Izquierdo, L. et al. Adhesion molecules alpha, beta and gamma-catenin as prognostic factors of tumour progression in upper urinary tract urothelial tumours: the role of AKT-P/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *BJU Int.* **104**. 100-6. (2009).
- 65 Herbst, R.S. et al: Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* **6**. 790–97 (2000).
- 66 Talvensaaari-Mattila, A. et al: Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. *Cancer.* **83**. 1153–62 (1988).
- 67 Lokeshwar, B.L. et al: Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinases secretion by malignant tissues. *Cancer Res.* **53**. 4493–98 (1993).
- 68 Nakanishi, K. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Hum Pathol.* **31**. 193-200 (2000).
- 69 Miyata, Y., Kanda, S., Nomata, K., Hayashida, Y. & Kanetake, H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology.* **63**. 602-8 (2004).
- 70 Kamijima, S. et al. The prognostic value of p53, Ki-67 and matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Int J Urol.* **12**. 941-7 (2005).

- 71 Li, W.M. et al. Matrix metalloproteinase-11 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in urothelial carcinomas. *J Surg Oncol.* **113.** 700-7 (2016).
- 72 Alberts, B. et al. "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). 1115. (Garland Science, 2008).
- 73 Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* **3.** 917-21 (1997).
- 74 Jeong, I.G. et al. Prognostic value of apoptosis-related markers in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Hum Pathol.* **40.** 668-77 (2009).
- 75 Mathieu, R. et al. Survivin is not an independent prognostic factor for patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study. *Urol Oncol.* **33.** 495.e15-22 (2015).
- 76 Nakanishi, K. et al. Expression of survivin does not predict survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch.* **441.** 559-63 (2002).
- 77 Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* **275.** 1132-6 (1997).
- 78 Karam, J.A. et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol.* **8.** 128-36 (2007).
- 79 Yoshimine, S. et al. Prognostic significance of Bcl-xL expression and efficacy of Bcl-xL targeting therapy in urothelial carcinoma. *Br J Cancer.* **108.** 2312-20 (2013).
- 80 Netto, G.J. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? *Nat Rev Urol.* **13.** 41-51 (2011).
- 81 Gupta, S. et al. Systemic immunotherapy for urothelial cancer : current trends and future directions. *Cancers.* [Epub ahead of print] (2017).

TABLE 1 – Tissue-based markers in upper tract urothelial carcinoma and its molecular function.

TISSUE-BASED MARKERS	FUNCTION
Cell cycle regulation	
p53	Tumor suppressor gene that maintains genomic stability by preventing genome mutation. When mutated, tumor suppression is compromised and tumors can develop.
Cyclins	Proteins that regulates the progression of cells through the cell cycle (G1/S transition) by activation of cyclin-dependent kinase. Dysregulation of CDK-cyclin complexes can promote tumor cell growth
p21 and p27	Members of the cyclin-dependent kinase family. Function as tumors suppressors and loss of its expression is associated with tumor development and progression
Cell growth, proliferation and signal transduction	
Ki67	Nuclear protein associated with cellular proliferation. Marker of growth factor for a specific cell population
HER-2	Member of the ErbB family of receptors (plasma membrane-bound receptor tyrosine kinases). Play an important role in tumor cell growth and development. Amplification or overexpression of HER-2 stimulates PI3K/AKT pathway and is associated with the development and progression of cancer
EGFR	Transmembrane glycoprotein with tyrosine kinase activity and also member of the ErbB family of receptors. EGFR activation stimulates intrinsic intracellular protein-tyrosine kinase activity, leading to DNA synthesis and cell proliferation. EGFR overexpression or upregulation is associated with malignant tumors
NF-κB	Complex protein that regulates genes which controls cell proliferation and survival. NF-κB is inactive and sequestered in the cytoplasm. Several stimuli factors can activate and release NF-κB which translocate to the nucleus. In the active form, it can regulates the expression of several genes associated with anti-apoptosis, inflammation, proliferation, invasion and angiogenesis
Angiogenesis	
HIF-1α	Transcription factor that plays an important role in oxygen homeostasis. Levels of subunit HIF-1α protein can increase rapidly due to response to hypoxia and up-regulates a number of factors important for tumor expansion
Vasohibin-1	Angiogenic molecule expressed in endothelial cells and upregulated by VEGF and fibroblast growth factor-2. VASH1 expression is restricted to endothelial cells of blood vessels in the tumor stroma and has a positive correlation between MVD and VASH1
Thrombospondin-1	Potent inhibitor of angiogenesis in physiological and pathological conditions and works inhibiting proliferation of tube-like structures in endothelial cells. TSP-1 expression is inversely related to MVD
FGFR3	Part of a tyrosine kinase receptor family that regulates several cellular processes such as growth, differentiation and angiogenesis
Cell differentiation	
Uroplakin	Specific differentiation products of urothelial cells and is undetectable in nonurothelial tissues. Present at the apical surface and cytoplasm of umbrella cells and can be use as markers for urothelial differentiation
Cell adhesion/EMT	
Snail	Considered a EMT transcription factor that can repress E-cadherin and therefore regulates tumor progression and metastasis
E-cadherin	Calcium-dependent glycoprotein essential to epithelial tissue integrity. Expressed in epithelial cells where cytoplasmic domain binds with subtypes β- or γ- of the catenin proteins and secure attachment to the actin microfilament, thus ensuring cytoskeleton integrity and stable cellular adhesion. Decrease E-cadherin can lead to loss of cellular adhesion resulting in invasive tumors

N-cadherin	Expressed by mesenchymal cells. Decreased expression of E-cadherin and increase of N-cadherin has been established as a feature of epithelial to mesenchymal transition in epithelial malignancies and has been shown to be associated with the acquisition of aggressive phenotypes
Catenins	Family of proteins found in complexes with cadherin cell adhesion molecules. They have the role of connecting cadherins to actin filaments ensuring cytoskeleton integrity and stable cellular adhesion
MMPs	Part of a family of protease capable of degrading all kind of extracellular matrix proteins. Tumor cell invasion and metastasis are biologically dependent on the proteolytic destruction of surrounding matrix components
Apoptosis	
Survivin	Member of a family of proteins that partly inhibits apoptosis by blocking downstream caspase activity
Bcl-2	Bcl-2 is an antiapoptotic protein which blocks caspase activation by inhibiting the mitochondrial release of cytochrome-c
Caspase	Proteases that can be activated by intrinsic or extrinsic pathways that induce cell death by apoptosis

Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; EGFR, endothelial growth factor receptor; NF- κ B, nuclear factor- κ B; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; VEGF, vascular endothelial growth factor; MVD, microvessel density; VASH1, vasohibin-1; TSP-1, thrombospondin-1; FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; MMPs, metalloproteinases; Bcl-2, B-cell lymphoma 2 oncogene.

TABLE 2 – Tissue-based markers in upper tract urothelial carcinoma and its prognostic implications

TISSUE-BASED MARKERS	PATHOLOGICAL	BLADDER RECURRENCE	RFS	CSS	OS	REF.
<i>Cell cycle regulation</i>						
p53	High pTstage; high grade		multivariate	multivariate	multivariate	14,15,16
Cyclins			univariate			18,19
p21						22
p27	High pTstage; high grade				multivariate	20,22
<i>Cell growth, proliferation and signal transduction</i>						
Ki67	High pTstage; high grade; LVI; sessile tumor; tumor necrosis, Cis, LN+	multivariate	multivariate	multivariate		23,24,25,26,27,28
HER-2	High pTstage; high grade; LVI; tumor necrosis; LN+	multivariate	multivariate	multivariate	multivariate	30,31,32,33

EGFR	High pT stage; high grade	multivariate	univariate			27,36
NF-κB				multivariate	multivariate	38
Angiogenesis						
HIF-1α	High grade; sessile tumor		multivariate		multivariate	40
Vasohibin-1	High pTstage; high grade		multivariate	multivariate		42
Thrombospondin-1	High pTstage; high grade		univariate	univariate		46
FGFR3	Low pTstage; low grade					49,50
Cell differentiation						
Uroplakin	High pTstage; high grade			multivariate		52,53
Cell adhesion/EMT						
Snail	High pTstage; high grade; LVI		multivariate	multivariate		56
E-cadherin	High pTstage; high grade; LVI, tumor necrosis; Cis; LN+; sessile tumor; multifocality		univariate	univariate		58,59,60
N-cadherin	High pT stage; LN+; sessile tumor	multivariate	multivariate			59,61
Catenins	Larger tumors (>3cm)		multivariate	multivariate		63,64
MMPs	High pTstage; high grade; LVI; LN+		multivariate	multivariate	univariate	68,69,71
Apoptosis						
Survivin	High pTstage; LN+; LVI; tumor necrosis; sessile tumor		multivariate	multivariate		74,75
Bcl-2				multivariate		79
Caspase	High pTstage; high grade		univariate	univariate		74

Abbreviations: RFS, recurrence-free survival; CSS, cancer-specific survival; OS, overall survival; LVI, lymphovascular invasion; Cis, carcinoma in situ; LN+, lymph node metastasis; EMT, epithelial-mesenchymal transition; MMPs, metalloproteinases; EGFR, endothelial growth factor receptor; NF-κB, nuclear factor-κB; HIF-1α, hypoxia-inducible factor 1α; FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; MMPs, metalloproteinases; Bcl-2, B-cell lymphoma 2 oncogene; REF, references.

BOX 1 – Molecular prognostic markers in UTUC

- p53 overexpression (inactivation/accumulation)
- Cyclins A and E overexpression
- Loss or lower expression of p21 and p27
- Overexpression of Ki67 (proliferation index)
- HER-2 overexpression and amplification
- EGFR overexpression
- NF- κ B overexpression
- HIF-1 α overexpression
- High levels and high density of VASH1
- Loss or lower expression of TSP-1
- FGFR mutation/overexpression (protective)
- Negative UPII and UPIII expression
- Snail overexpression
- Loss of E-cadherin expression
- Positive N-cadherin expression
- Abnormal expression of α , β and γ -catenin
- Overexpression of MMP-2, MMP-9 and MMP-11
- Altered survivin expression
- Altered expression of Bcl-2 and caspase-3 (apoptosis related markers)

3 ARTIGO 2

3.1 PROGNOSTIC ROLE OF DECREASED E-CADHERIN EXPRESSION IN PATIENTS WITH UPPER TRACT UROTHELIAL CARCINOMA: A MULTI-INSTITUTIONAL STUDY

Ricardo L. Favaretto ^a, Atessa Bahadori ^b, Romain Mathieu ^{b,c}, Andrea Haitel ^d, Bernhard Grubmüller ^b, Vitaly Margulis ^e, Jose A. Karam ^f, Morgan Rouprêt ^g, Christian Seitz ^b, Pierre I. Karakiewicz ^h, Isabela W. Cunha^a, Stenio C. Zequi^a, Christopher G. Wood ^f, Alon Z. Weizer ⁱ, Jay D. Raman^j, Mesut Remzi ^b, Nathalie Rioux-Leclercq ^k, Solene Jacquet-Kammerer ^k, Karim Bensalah ^c, Yair Lotan ^e, Alexander Bachmann ^l, Michael Rink ^m, Alberto Briganti ⁿ, Shahrokh F. Shariat ^{b,e,o}

a Department of Urology, A. C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil.

b Department of Urology, Medical University Vienna, General Hospital, Vienna, Austria.

c Department of Urology, Rennes University Hospital, Rennes, France.

d Department of Pathology, Medical University Vienna, Vienna, Austria.

e Department of Urology, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX, USA.

f Department of Urology, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.

g Academic Department of Urology, La Pitié-Salpêtrière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, University Paris 6, Paris, France.

h Cancer Prognostics and Health Outcomes Unit, University of Montreal Health Centre, Montreal, Canada.

i Department of Urology, University of Michigan Cancer Center, Ann Arbor, MI, USA.

j Division of Urology, Penn State Milton S.Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA.

k Department of Pathology, Rennes University Hospital, Rennes, France.

l Department of Urology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland.

m Department of Urology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

n Department of Urology, Vita Salute San Raffaele University, Milan, Italy.

o Department of Urology, Weill Cornell Medical College, New York, NY, USA.

Key words: E-cadherin, urothelium, carcinoma, recurrence, prognosis, survival, prediction.

Corresponding author:

Shahrokh F. Shariat

Department of Urology and Comprehensive Cancer Center

Medical University of Vienna, Vienna General Hospital

Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Vienna, Austria

Office: +43 1 40400 2615

Fax: +43 1 40400 2332

Email: shahrokh.shariat@meduniwien.ac.at

Publicado: World J Urol. 2016 Apr 29. [Epub ahead of print]. DOI:10.1007/s00345-016-1835-1

Abstract:

Purpose: To assess the role of E-cadherin as prognostic biomarker in Upper Tract Urothelial Carcinoma (UTUC) in a large multi-institutional cohort of patients.

Methods: Immunohistochemistry technique was used to evaluate E-cadherin expression in 678 patients with unilateral, sporadic UTUC treated with RNU. E-cadherin expression was considered decreased if 10% or more cells had decreased expression (<90%).

Results: Decreased E-cadherin expression was observed in 353 patients (52.1%) and was associated with advanced pathological stage ($P < 0.001$), higher grade ($P < 0.001$), lymph node metastasis ($P = 0.006$), lymphovascular invasion ($P < 0.001$), concomitant carcinoma in situ ($P < 0.001$), multifocality ($P = 0.004$), tumor necrosis ($P = 0.020$) and sessile architecture ($P < 0.001$). Within a median follow-up of 30 months (interquartile range: 15-57) 171 patients (25.4%) experienced disease recurrence and 150 (21.9%) died from UTUC. In univariable analyses, decreased E-cadherin expression was significantly associated with worse recurrence-free survival (RFS) ($P < 0.001$) and cancer-specific survival CSS ($P = 0.006$); however, in

multivariable analyses, it was not ($P = 0.74$ and 0.84 , respectively). The lack of independent prognostic value of E-cadherin remained true in all subgroup analyses.

Conclusions: In UTUC patients treated with RNU, decreased E-cadherin expression is associated with features of biologically and clinically aggressive disease and worse outcome in univariable, but not multivariable, analyses.

If E-cadherin's association with factors of advanced disease is confirmed on UTUC biopsy specimens, it could be used to help in the clinical decision-making regarding kidney-sparing approaches and/or neo-adjuvant chemotherapy.

Introduction

Upper tract urothelial carcinoma (UTUC) is a rare disease, accounting for 5 to 10% of all urothelial carcinomas [1]. In the last two decades, management of UTUC has improved but still remains challenging. Radical nephroureterectomy (RNU) remains the standard treatment for non-metastatic disease [1,2]. However, kidney-sparing approaches are now considered for low-risk UTUC and conversely, regional lymphadenectomy and peri-operative chemotherapy are discussed in addition to RNU for high-risk UTUC [1,2]. Current concerns lay in the identification of the patients who may benefit from these treatments. Recent evidence suggests that carcinogenetic mechanisms in UTUC are different from urothelial carcinoma of the bladder (UCB) [2,3,4]. Therefore, molecular alterations from one setting may not be extrapolated in the other. In this regard, specific validation of biomarkers in UTUC is mandatory to develop predictive tools that could allow accurate clinical decision-making in the management of UTUC patients.

Decreased expression of the membrane associated glycoprotein E-cadherin has been established as a feature of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial malignancies [5,6,7]. In normal cells, E-cadherins' cytoplasmic domain binds with subtypes β - or γ - of the catenin proteins, which in turn secure attachment to the actin microfilament, thus ensuring cytoskeleton integrity and stable cellular adhesion [8]. Loss of cellular adhesion is a tipping point in tumor progression resulting in poorly differentiated and invasive tumors [7,8]. E-cadherin has been shown to be an independent prognostic factor in UCB [3,9]. In UTUC, single-center studies with small cohorts have investigated the role of E-cadherin expression with conflicting results [10-15]. We hypothesized that E-cadherin expression in RNU specimens was associated with features of biologically and clinically aggressive UTUC, thereby potentially helping in the clinical decision-making of UTUC patients. To assess this hypothesis, we tested the association of E-cadherin with pathologic characteristics and prognosis in a large multi-institutional cohort of patients treated by RNU for UTUC.

Material and Methods

Patient selection

This was a retrospective, institutional review board-approved study involving seven institutions from the International UTUC collaboration [16]. The initial study cohort comprised 753 patients who underwent RNU for upper tract urothelial carcinoma (Ta-T4 N0-1 M0) between March 1990 and May 2008. Exclusion criteria included

neo-adjuvant chemotherapy/radiotherapy and follow-up less than 3 months, resulting in a final cohort of 678 patients.

Data collection, pathological evaluation, and immunochemistry

A computerized database was used to collect patient and tumor characteristics. All surgical specimens were processed according to standard pathological procedures. Original pathology slides were centrally collected and analyzed by genitourinary pathologists blinded to clinical outcome. Pathological stage was determined according to the 2002 tumor, node and metastasis (TNM) staging system, and the pathological grading using the 1998 WHO/ISUP consensus classification. The tumors were architecturally defined as papillary or sessile [17]. The presence of tumor cells within an endothelium-lined space without underlying muscular walls was defined as lymphovascular invasion (LVI) [18]. Multifocal tumor [19], carcinoma in situ and tumor necrosis [20] were confirmed in every slide.

E-cadherin staining was performed on formalin-fixed tissue microarray slides constructed for the study in a single laboratory, as described previously [9]. Antigen retrieval was performed and the primary anti-E-CD monoclonal mouse antibody (Transduction Labs, dilution 1:25 in blocking solution) was incubated for 1 hour. Secondary antibody (Vector Labs) was applied at a dilution of 1:400. Reactivity was visualized with an avidin-biotin complex immunoperoxidase system using diaminobenzidine as the chromogen and methyl green and Alcian blue as the counterstain. Positive controls included bladder and prostate tissue known to possess 100% preserved E-cadherin expression (external control) and normal urothelium (internal

control) included in cancer specimens. Negative controls were serial sections processed without incubation in primary antibody. Areas of urothelial tumor were classified as normal (90% to 100% cells with preserved cell border staining resembling membranous staining of normal controls) and abnormal, which included negative (0% to 10% positive tumor cells) and various degrees of heterogeneous decreased expression (11% to 89% positive tumor cells) (Figure 1). Multiple sections from the same patient were evaluated to minimize the effect of the staining technique on interpretation. The negative and the heterogeneously staining tumors were considered together in statistical calculations based on the premise that the negative areas of the heterogeneous tumors would define the biologic behavior of the tumor as a whole [9,21].

Management and follow-up

All patients underwent standard RNU [1]. Additionally, a regional lymphadenectomy was performed in 155 patients (22.9%) and 68 patients (10%) received adjuvant chemotherapy. Postoperative follow-up was generally performed every 3 months the first year after surgery, every 6 months in the second year and annually thereafter. Relapse was defined by local recurrence or distant metastasis. Cause of death was determined by chart review or death certificate [22].

Statistical analyses

Outcomes included recurrence-free survival (RFS) and cancer-specific survival (CSS). Chi-square test was used to assess decreased E-cadherin expression with categorical variables. Differences in continuous variables were analyzed using Kruskal-Wallis tests. The Kaplan-Meier method was used to estimate RFS and CSS; log-rank tests were applied for pairwise comparison of survival. Univariable and multivariable Cox regression models addressed associations of RFS and CSS with potential prognostic factors. We performed subgroup analyses in patients with pTa-4 high-grade disease, pTa-2 N0/Nx, pT1-T3 N0/Nx, pT3/pT4 N0/Nx, pTa-4 pN0 and pTa-4 pN1 disease. All P values were two-sided and statistical significance was defined as $P < 0.05$. Statistical analyses were performed using Stata 11.0 statistical software (StataCorp., College Station, TX).

Results

Descriptive characteristics and association with pathology

Decreased E-cadherin expression was observed in 353 patients (52.1%). There was a significant association between decreased E-cadherin expression and pathological adverse features such as advanced pathological tumor stage ($P < 0.001$), high pathological tumor grade ($P < 0.001$), lymph node metastases ($P = 0.006$), LVI ($P < 0.001$), concomitant carcinoma in situ ($P < 0.001$), multifocality ($P = 0.004$), tumor necrosis ($P = 0.020$) and sessile architecture ($P < 0.001$) (Table 1).

Association of decreased E-cadherin expression with cancer recurrence and cancer-specific survival

The median follow-up time was 30 months (15-57). Within this period 171 patients (25.4%) experienced disease recurrence and 150 (21.9%) died from UTUC. In univariable analyses, decreased E-cadherin expression was associated with a higher probability of disease recurrence (Log rank test $P < 0.001$; HR = 1.69 95% CI: 1.23-2.30) (Figure 2A) and cancer-specific mortality (Log rank test $P = 0.006$; HR = 1.57, 95% CI: 1.13-2.19) (Figure 2B). Table 2 and 3 summarize the Cox regression analyses. In multivariable analyses, decreased E-cadherin expression was not associated independently with either RFS (HR = 1.06, $P = 0.74$) or CSS (HR = 0.96, $P = 0.84$) (Table 2).

Further univariable analyses in subgroups of patients revealed that decreased E-cadherin expression was associated with worse outcomes in patients with pTa-4 M0 high grade tumors (HR = 1.55, $P < 0.011$) and pTa-2 pN0/Nx M0 tumors (HR = 2.20, $P < 0.038$) regarding RFS and in patients with pTa-4 M0 high grade tumors (HR = 1.50, $P < 0.025$) regarding CSS (Table 3). However, in these subgroups, the prognostic value of E-cadherin did not retain statistical significance when adjusted for the effects of standard clinico-pathological features.

Discussion

In this study, we assessed the clinical significance of a decreased E-cadherin expression in an international cohort of 678 UTUC patients treated with RNU. We

found that decreased E-cadherin expression in tumor cells is associated with adverse clinico-pathological features and worse outcomes.

Half of the patients in this cohort presented with decreased expression of E-cadherin in the tumor. This was within the range previously reported in UCB patients (31-77%) [8,9] but lower than that reported in UTUC patients (68-71%) [10,11]. This could be due to our lower proportion of high stage tumors compared to the two other studies (50% versus 54% and 61%), as well as methodological differences in scoring, staining protocols, choice of antibody and/or antigen retrieval.

Patients with decreased E-cadherin were most likely to harbor tumors with features of biologically aggressive disease. This association is in line with the biological role of E-cadherin, as a calcium-dependent glycoprotein essential to epithelial tissue integrity. Loss of cellular adhesion results in the detachment of cancerous cells from the primary lesion, promoting invasiveness [23]. In carcinoma in situ of the bladder, for example, loss of E-cadherin expression predicts RFS, disease progression and CSS [21]. Similar results were reported in various UCB studies [8,9,24-27] and one UTUC study [10]: loss of E-cadherin immunoreactivity strongly correlated with advanced stage and high-grade tumors.

We further evaluated the relevance of E-cadherin as a biomarker to predict outcomes after RNU. The role of E-cadherin expression as a prognostic factor in urothelial carcinoma was supported by previous studies mainly focusing on UCB [8,9,24-27]. Our results confirm that decreased E-cadherin expression is indeed associated with a higher probability of disease recurrence and cancer-specific mortality in UTUC. However, when adjusted for the effects of established prognostic factors in multivariable analyses, E-cadherin expression lost its independent prognostic value

and, therefore, may have only limited value in clinical practice. Previous studies that addressed the relationship between E-cadherin and outcomes in UTUC led to conflicting results. Fromont et al. [14] showed, in a cohort of 62 UTUC patients, that decreased E-cadherin expression was an independent prognostic factor for disease-free and overall survival. Conversely, most of the studies published thereafter with larger cohorts failed to demonstrate independent association between E-cadherin expression and disease recurrence after RNU [10-13].

Consistent with the literature [10-13], we found, in our subgroup analysis that, E-cadherin failed to demonstrate any independent prognostic value, outlining its strong association with other established pathological prognostic factors. We found a significant association between E-cadherin expression and adverse clinico-pathological features such as advanced pathological tumor stage, high pathological tumor grade, lymph node metastases, LVI, concomitant carcinoma in situ, multifocality, tumor necrosis, and sessile architecture. All these factors have been independently associated with worse outcome in UTUC [1,2,19,20,28-30].

The biological and clinical roles of the E-cadherin-related pathways in urothelial carcinomas are yet to be understood. Indeed, the regulation of E-cadherin is linked to many different biomarkers [2,3]. Some of them have been already assessed in UTUC. Among them, Snail, a transcription factor is thought to repress the transcription of E-cadherin by binding to elements found in the E-cadherin promoter [12]. An increased Snail expression has been reported as an independent prognostic predictor of recurrence-free and cancer-specific survival [12]. During EMT, it is thought that transcriptional regulation results in suppression of epithelial markers and gain of mesenchymal markers [7,12]. This process, recognized in different types of

cancer including bladder cancer [31,32] and UTUC [11] has been observed between epithelial E-cadherin and mesenchymal N-cadherin and has been termed the “cadherin switch”. The novel genotype results in an alteration of normal tissue architecture and high-grade, invasive tumors. To our knowledge, only one study by Muramaki et al. [11] addressed the role of N-cadherin expression in UTUC: in this study including 59 patients, N-cadherin expression was an independent prognostic factor of intra- and extravesical recurrence after RNU. Combining several biomarkers may help characterize the different pathways involved in tumor aggressiveness and create a prediction algorithm that would improve prognostication, clinical outcome and thus, patient survival [33]. At this time the ideal combination of biomarkers remains unfortunately elusive. From the bladder cancer literature and some preliminary upper urinary tract literature, cell cycle markers (p53, pRB, p21, p27 and Cyclins), apoptosis markers (Fas, Caspase-3, Bcl-2 and Survivin) and proliferation markers (Ki67) may be used for a combined approach [34]. Snail expression, N-cadherin expression, AKT pathway, β - or γ - catenins and matrix metalloproteinases are molecular markers associated with EMT that could be analyzed in a combined approach with E-cadherin expression.

We acknowledge that our study has some limitations. First and foremost are those related to its retrospective nature and the immunohistochemical technique. Indeed, this latter technique may be associated with a lack of reproducibility related to the choice of antibodies, the specimen handling procedures, technical demands and scoring protocols. However, tissue microarray with staining protocols and automated scoring systems based on bright field microscopy imaging coupled with advanced color detection software were used to overcome these common limitations. Finally,

decreased expression of E-cadherin was defined according to a standard cut-off used in UCB and use of new thresholds may have led to different conclusions.

Conclusion

Decreased E-cadherin expression is associated with adverse clinico-pathological UTUC features and worse outcomes in univariable analyses. E-cadherin expression is, however, not an independent prognostic factor when adjusted for the effects of established prognostic factors, limiting its use in clinical decision-making regarding prognosis after RNU. If E-cadherin's association with factors of advanced disease is confirmed on UTUC biopsy specimens, it could be used to help in the clinical decision-making regarding kidney-sparing approaches and/or neo-adjuvant chemotherapy.

References

- 1 Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, Zigeuner R, Sylvester R, Burger M et al. European guidelines on upper tract urothelial carcinomas: 2013 update. *European urology* 2013; 63(6):1059-1071.
- 2 Lughezzani G, Burger M, Margulis V, Matin SF, Novara G, Roupert M et al. Prognostic factors in upper urinary tract urothelial carcinomas: a comprehensive review of the current literature. *European urology* 2012; 62(1):100-114.
- 3 Yates DR, Catto JW. Distinct patterns and behaviour of urothelial carcinoma with respect to anatomical location: how molecular biomarkers can augment clinico-pathological predictors in upper urinary tract tumours. *World journal of urology* 2013; 31(1):21-29.

- 4 Green DA, Rink M, Xylinas E, Matin SF, Stenzl A, Roupret M et al. Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: disparate twins. *The Journal of urology* 2013;189(4):1214-1221.
- 5 Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences* 2008;65(23):3756-3788.
- 6 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(4):704-715.
- 7 Baumgart E, Cohen MS, Neto BS, Jacobs MA, Wotkowicz C, Rieger-Christ KM et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clinical Cancer Research* 2007;13(6):1685-1694.
- 8 Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, Mauny F, Félix S, Algros MP et al. Expression of E-Cadherin and α -, β -, γ -Catenins in Patients With Bladder Cancer Identification of γ -Catenin as a New Prognostic Marker of Neoplastic Progression in T1 Superficial Urothelial Tumors. *American journal of clinical pathology* 2006;125(1):119-126.
- 9 Byrne RR, Shariat SF, Brown R, Kattan MW, Morton RA, Wheeler TM et al. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term follow-up. *The Journal of urology* 2001;165(5):1473-1479.
- 10 Nakanishi K, Kawai T, Torikata C, Aurues T, Ikeda T. E-cadherin expression in upper-urinary-tract carcinoma. *International journal of cancer* 1997;74(4):446-449.
- 11 Muramaki M, Miyake H, Terakawa T, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. *Urology* 2001;78(6):1443-e7.
- 12 Kosaka T, Kikuchi E, Mikami S, Miyajima A, Shirotake S, Ishida M. Expression of snail in upper urinary tract urothelial carcinoma: prognostic significance and implications for tumor invasion. *Clinical Cancer Research* 2010;16(23):5814-5823.

- 13 Jeon HG, Jeong IG, Bae J, Lee JW, Won JK, Paik JH et al. Expression of Ki-67 and COX-2 in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *Urology* 2010;76(2):513-e7.
- 14 Fromont G, Rouprêt M, Amira N, Sibony M, Vallancien G, Validire P et al. Tissue microarray analysis of the prognostic value of E-cadherin, Ki67, p53, p27, survivin and MSH2 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *European urology* 2005;48(5):764-770.
- 15 Reis STD, Leite KRM, Mosconi Neto A, Pontes Júnior J, Viana NI, Antunes AA et al. Immune expression of E-cadherin and α , β and γ -Catenin adhesion molecules and prognosis for upper urinary tract urothelial carcinomas. *International braz j urol* 2012;38(4):466-473.
- 16 Mathieu R, Klatte T, Margulis V, Karam JA, Rouprêt M, Seitz C et al. Survivin is not an independent prognostic factor for patients with upper tract urothelial carcinoma: A multi-institutional study. *Urologic Oncology* 2015;33(11):495.e15-22.
- 17 Remzi M, Haitel A, Margulis V, Karakiewicz P, Montorsi F, Kikuchi E et al. Tumour architecture is an independent predictor of outcomes after nephroureterectomy: a multi-institutional analysis of 1363 patients. *BJU international* 2009;103(3):307-311.
- 18 Shariat SF, Svatek RS, Tilki D, Skinner E, Karakiewicz PI, Capitanio U et al. International validation of the prognostic value of lymphovascular invasion in patients treated with radical cystectomy. *BJU international* 2010;105(10):1402-1412.
- 19 Chromecki TF, Cha EK, Fajkovic H, Margulis V, Novara G, Scherr DS et al. The impact of tumor multifocality on outcomes in patients treated with radical nephroureterectomy. *European urology* 2012;61(2):245-253.
- 20 Zigeuner R, Shariat SF, Margulis V, Karakiewicz PI, Roscigno M, Weizer A et al. Tumour necrosis is an indicator of aggressive biology in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *European urology* 2010;57(4):575-581.

- 21 Shariat SF, Pahlavan S, Baseman AG, Brown RM, Green AE, Wheeler TM et al. E-cadherin expression predicts clinical outcome in carcinoma in situ of the urinary bladder. *Urology* 2001;57(1):60-65.
- 22 Rink M, Fajkovic H, Cha EK, Gupta A, Karakiewicz PI, Chun FK et al. Death certificates are valid for the determination of cause of death in patients with upper and lower tract urothelial carcinoma. *European urology* 2012;61(4):854-855.
- 23 Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 1991;113(1):173-185.
- 24 Bryan RT, Atherfold PA, Yeo Y, Jones LJ, Harrison RF, Wallace DMA et al. Cadherin switching dictates the biology of transitional cell carcinoma of the bladder: ex vivo and in vitro studies. *The Journal of pathology* 2008;215(2):184-194.
- 25 Erdemir F, Ozcan F, Kılıcaslan I, Parlaktas BS, Uluocak N, Gokce O. The relationship between the expression of E-cadherin and tumor recurrence and progression in high-grade stage T1 bladder urothelial carcinoma. *International urology and nephrology* 2007;39(4):1031-1037.
- 26 Han B, Cui D, Jing Y, Hong Y, Xia S. Estrogen receptor β (ER β) is a novel prognostic marker of recurrence survival in non-muscle-invasive bladder cancer potentially by inhibiting cadherin switch. *World journal of urology* 2012;30(6):861-867.
- 27 Hu X, Ruan Y, Cheng F, Yu W, Zhang X, Larré S. p130Cas, E-cadherin and β -catenin in human transitional cell carcinoma of the bladder: Expression and clinicopathological significance. *International Journal of Urology* 2011;18(9):630-637.
- 28 Chromecki TF, Bensalah K, Remzi M, Verhoest G, Cha EK, Scherr DS et al. Prognostic factors for upper urinary tract urothelial carcinoma. *Nature Reviews Urology* 2011;8(8):440-447.
- 29 Otto W, Shariat SF, Fritsche HM, Gupta A, Matsumoto K, Kassouf W et al. Concomitant carcinoma in situ as an independent prognostic parameter for

- recurrence and survival in upper tract urothelial carcinoma: a multicenter analysis of 772 patients. *World journal of urology* 2011;29(4):487-494.
- 30 Cha EK, Shariat SF, Kormaksson M, Novara G, Chromecki TF, Scherr DS et al. Predicting clinical outcomes after radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. *European urology* 2012;61(4):818-825.
- 31 Bryan RT, Tselepis C. Cadherin switching and bladder cancer. *The Journal of urology* 2010;184(2):423-431.
- 32 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. *Clinical cancer research* 2006;12(9):2780-2787.
- 33 Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF. Challenges of cancer biomarker profiling. *European urology* 2007;52(6):1601-1609.
- 34 Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. *Lancet Oncol* 2007;8(2):128-36.

Table 1. Association of decreased E-cadherin expression with clinico-pathologic characteristics in 678 patients treated with radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma.

	All patients	Normal E-Cadherin	Decreased E-Cadherin	p
Total, n (%)	678	325 (47.9)	353 (52.1)	
Age (years)				0.19
Median (IQR)	69 (63-76)	69 (62-76)	70 (63-77)	
Gender, n (%)				0.78
Male	380 (56.1)	184 (56.6)	196 (55.5)	
Female	298 (43.9)	141 (43.4)	157 (44.5)	
Tumor stage, n (%)				<0.001
pTa	121 (17.8)	82 (25.2)	39 (11.1)	
pT1	208 (30.7)	98 (30.1)	110 (31.2)	
pT2	123 (18.1)	60 (18.5)	63 (17.8)	
pT3	193 (28.5)	74 (22.8)	119 (33.7)	
pT4	33 (4.9)	11 (3.4)	22 (6.2)	
Grade, n (%)				<0.001
Low	174 (25.6)	114 (35.1)	60 (17.0)	
High	504 (74.3)	211 (64.9)	293 (83.0)	
Lymph node status, n (%)				0.006
pNx	523 (77.2)	261(80.3)	262 (74.2)	
pN0	108 (15.9)	52 (16)	56 (15.9)	
pN1	47 (6.9)	12 (3.7)	35 (9.9)	
Lymphovascular invasion, n (%)				<0.001
Yes	135 (19.9)	26 (8.0)	109 (30.9)	
No	543 (80.1)	299 (92.0)	244 (69.1)	
Concomitant carcinoma in situ, n (%)				<0.001
Yes	128 (18.9)	41 (12.6)	87 (24.7)	
No	550 (81.1)	284 (87.4)	266 (75.3)	
Multifocality, n (%)				0.004
Yes	145 (21.4)	54 (16.6)	91 (25.8)	
No	533 (78.6)	271 (83.4)	262 (74.2)	
Necrosis, n (%)				0.020
Yes	81 (11.9)	29 (8.9)	52 (14.7)	
No	597 (88.1)	296 (91.1)	301 (85.3)	
Architecture, n (%)				<0.001
Papillary	558 (82.3)	293 (90.1)	265 (75.1)	
Sessile	120 (17.7)	32 (9.9)	88 (24.9)	
Location				0.70
Kidney	478 (70.5)	232 (71.4)	246 (69.7)	
Ureter	200 (29.5)	93 (28.6)	107 (30.3)	

Table 2. Multivariable Cox regression analyses predicting disease recurrence and cancer-specific mortality of 678 patients treated with radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma.

	Disease free survival			Cancer-specific survival		
	HR	95 % CI	p value	HR	95 % CI	p value
Male gender	0.76	0.56 - 1.04	0.085	0.78	0.56 - 1.08	0.13
Age	1.02	0.99 - 1.03	0.052	1.03	1.01 - 1.04	0.006
Pathological stage	Ref.			Ref.		
Ta						
T1	1.80	0.76 - 4.28	0.184	1.48	0.57 - 3.80	0.42
T2	3.58	1.52 - 8.44	0.003	3.49	1.40 - 8.73	0.008
T3	7.31	3.21 - 16.65	<0.001	6.29	2.58 - 15.31	<0.001
T4	32.98	12.81 - 84.87	<0.001	25.16	9.11 - 69.53	<0.001
Pathological high grade	1.38	0.82 - 2.32	0.23	1.59	0.89 - 2.82	0.12
Lymphovascular invasion	1.14	0.80 - 1.64	0.47	1.31	0.89 - 1.92	0.16
Concomitant CIS	1.52	1.03 - 2.23	0.035	1.06	0.69 - 1.63	0.78
Architecture	1.27	0.86 - 1.86	0.23	1.35	0.89 - 2.06	0.15
Necrosis	0.46	0.29 - 0.75	0.002	0.51	0.30 - 0.85	0.009
Multifocality	1.44	1.01 - 2.056	0.045	1.78	1.22 - 2.58	0.003
Kidney location	1.17	0.86 - 1.60	0.32	1.26	0.90 - 1.76	0.18
Lymph node metastasis	2.40	1.57 - 3.66	<0.001	2.28	1.46 - 3.55	<0.001
E-cadherin decreased expression	1.06	0.76 - 1.48	0.74	0.96	0.68 - 1.38	0.84

CI: confidence interval, CIS: carcinoma in situ, HR: hazard ratio.

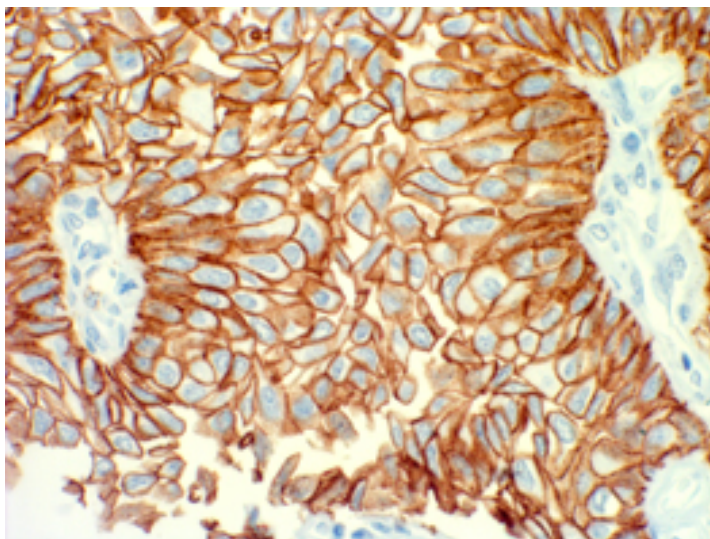
Table 3. Univariable and Multivariable Cox regression analyses for prediction of disease recurrence and cancer specific survival according to E-cadherin expression status in subgroups of patients treated with radical nephroureterectomy.

	Recurrence-free survival						Cancer-specific survival					
Patient subgroups	Univariable			Multivariable			Univariable			Multivariable		
	HR	95 % CI	p value	HR	95 % CI	p value	HR	95 % CI	p value	HR	95 % CI	P value
pTa-4 High grade	1.55	1.11 - 2.17	0.01	1.11	0.77 - 1.59	0.57	1.50	1.05 - 2.14	0.03	1.08	0.73 - 1.59	0.70
pTa-2 pN0/Nx	2.20	1.05 - 4.62	0.04	1.37	0.62 - 3.02	0.44	1.75	0.78 - 3.93	0.18	1.01	0.42 - 2.46	0.98
pT1-3 pN0/Nx	1.28	0.88- 1.87	0.20	0.99	0.66 - 1.48	0.96	1.19	0.79 - 1.79	0.40	0.92	0.60 - 1.41	0.70
pT3/pT4 N0/Nx	0.90	0.58 - 1.40	0.64	0.77	0.48 - 1.25	0.30	0.84	0.53 - 1.35	0.49	0.74	0.45 - 1.23	0.25
pTa-4 pN0	1.65	0.77 - 3.56	0.20	1.06	0.39 - 2.92	0.91	1.23	0.55 - 2.78	0.61	0.87	0.25 - 2.95	0.82
pTa-4 pN1	1.39	0.57 - 3.40	0.47	1.78	0.56 - 5.71	0.33	1.34	0.54 - 3.29	0.53	3.09	0.72 - 13.25	0.13

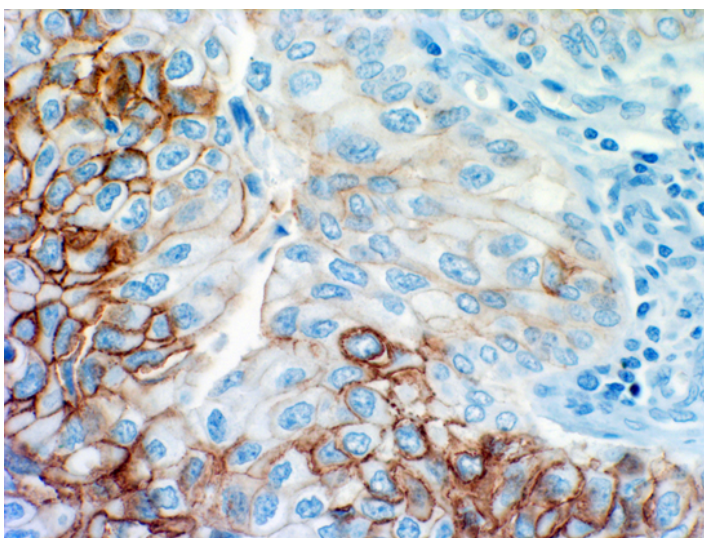
CI: confidence interval, HR: hazard ratio.

Figure 1. E-cadherin immunohistochemical staining of upper tract urothelial carcinoma : (A) normal expression (range 90% to 100%), (B) heterogenous expression (range 11% to 89%) and (C) absent expression (range 0% to 10%)

A



B



C

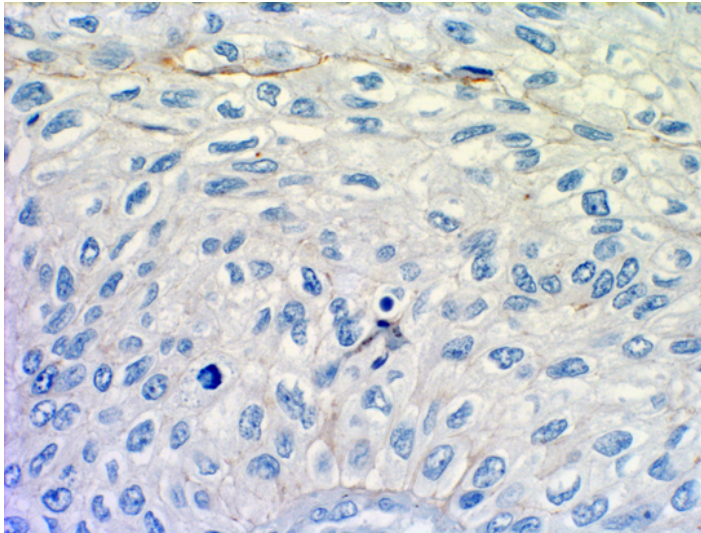
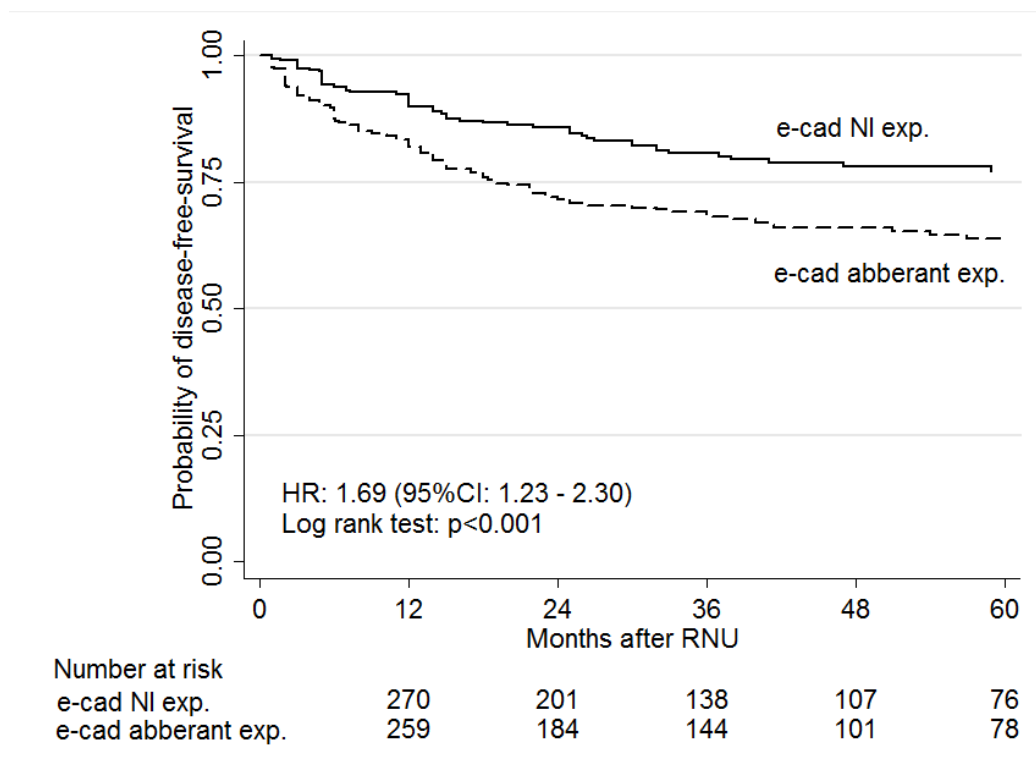
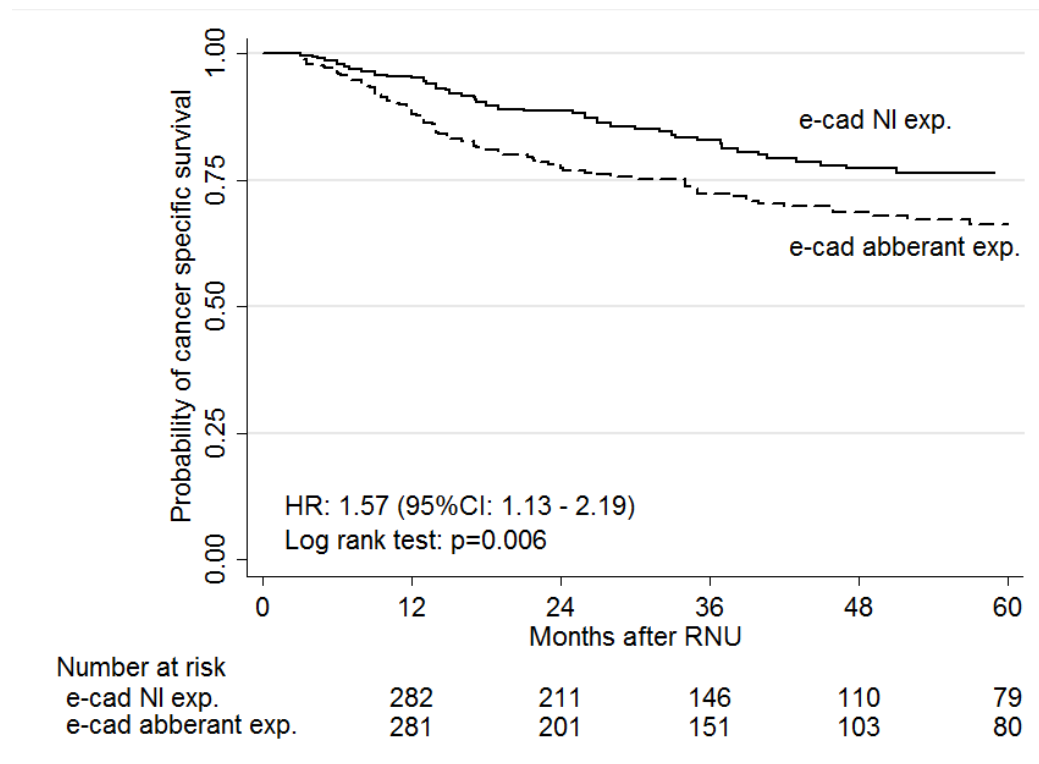


Figure 2. Kaplan Meier estimates of disease free survival (A) and cancer specific survival (B) according to the expression of E-cadherin in 678 patients treated with radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma

A.



B.



4 DISCUSSÃO

Conforme descrito, o CUTS é uma neoplasia relativamente rara, agressiva e com evolução geralmente heterogênea. Pacientes com tumores não invasivos e de baixo grau possuem desfecho completamente diferente de pacientes com tumores infiltrativos e de alto grau. Dessa forma, a correta identificação desses pacientes é de extrema importância para a tomada de decisões terapêuticas. E extrapolar resultados da literatura mais robusta de CUB em CUTS se mostra de certa forma equivocada, já que estudos sugerem que o mecanismo de carcinogênese em CUTS é diferente se comparado aos tumores uroteliais de trato urinário inferior (GREEN et al. 2013; YATES et al. 2013).

Nos últimos anos, devido à colaboração de diversos centros em todo o mundo, várias publicações surgiram identificando e estudando os diversos fatores prognósticos em CUTS. O uso isolado de fatores preditivos clínico-patológicos ainda é, de certa forma, limitado para a correta estratificação de risco e a tomada de decisões terapêuticas. No sentido de tentar melhorar a acurácia preditiva, estudos surgiram avaliando potenciais marcadores moleculares que possam ser usados tanto no estadiamento quanto no prognóstico dessa doença. Dessa forma, nossos dois estudos se somam a diversos trabalhos na literatura atual no sentido de adicionar conhecimento nesta área da oncologia.

Alguns artigos de revisão que analisam marcadores moleculares em CUTS foram publicados recentemente (CHROMECKI et al. 2011; LUGHEZZANI et al. 2012; MATHIEU et al. 2016), porém, nenhum se dedicou inteiramente a marcadores

teciduais, fornecendo informações detalhadas do funcionamento desses marcadores no processo de oncogênese, o impacto prognóstico e como eles poderiam afetar a tomada de decisões clínicas. Isso nos motivou a realizar essa revisão não sistemática. Através de uma extensa revisão da literatura publicada principalmente nos últimos 20 anos, conseguimos identificar em torno de 40 publicações que consideramos relevantes para o assunto. O que nos chamou a atenção foi a discrepância observada nos resultados desses diversos estudos. Isso pode ser em parte justificado pela característica heterogênea da casuística geralmente utilizada nos estudos de CUTS. Um artigo de revisão publicado por NETTO et al. (2011) descreveu as duas principais vias patogênicas em CUB, mostrando claramente as diferenças existentes em pacientes com doença músculo-invasivas se comparadas aos tumores não músculo invasivos. Nos casos de CUTS, diferentemente da casuística de estudos em CUB, pacientes com tumores músculo-invasivos e de alto grau são estudados juntamente com casos não músculo-invasivos e de baixo grau, devido, principalmente, à raridade da doença.

De qualquer forma, diversos marcadores moleculares teciduais, como o p53, Ki-67, EGFR, HER-2, marcadores de angiogênese (HIF1 α , VASH1 e TSP-1), snail, Uroplaquina, E-caderina, N-caderina e survivina, foram identificados como estando associados a tumores com características mais agressivas. Por outro lado, o FGFR3 foi identificado como marcador de tumores de baixo risco (baixo estágio e baixo grau histológico). Entretanto, nenhum desses marcadores são realmente utilizados na prática clínica. A maioria desses resultados ainda não foi validada, e boa parte são estudos retrospectivos realizados em centros únicos e com casuística pequena. Além do mais, esses estudos foram realizados em pacientes submetidos à NUR. A

identificação desses marcadores serviria apenas para indicação de quimioterapia adjuvante para os casos de tumores mais agressivos. Entretanto, sabemos que apenas 19% dos pacientes submetidos à NUR possuem função renal adequada para realização de quimioterapia baseada em cisplatina no pós-operatório (KAAG et al. 2010). Dessa forma, a validação desses resultados em espécimes de biópsia se torna mais adequada para utilização na prática clínica, na qual a identificação pré-operatória de pacientes com tumores de baixo risco *versus* pacientes com tumores mais agressivos se mostra mais útil. Assim, poderíamos indicar quimioterapia neoadjuvante e linfadenectomia estendida na ocasião da NUR para pacientes com tumores de alto risco e, eventualmente, evitar o tratamento radical nos casos de pacientes com tumores pouco agressivos.

Também foram identificados alguns marcadores moleculares associados a um risco aumentado de recorrência tumoral vesical após o tratamento radical, como o Ki-67, HER-2, EGFR e N-caderina. Alguns desses resultados foram baseados em estudos multi-institucionais com grande casuística (KRABBE et al. 2015; ABUFARAJ et al. 2016; LONG et al. 2016; SORIA et al. 2016). Apesar de também não serem utilizados na prática clínica, pois necessitam ainda de validação, esses marcadores poderiam ser utilizados para programação de vigilância vesical mais rigorosa, assim como indicação de instilação vesical com BCG ou Mitomicina C no sentido de diminuir o risco conhecidamente aumentado de recorrência vesical pós-NUR. Em relação aos marcadores moleculares como fatores preditivos de sobrevida (SLR ou SCE), os resultados ainda são conflitantes, porém, alguns marcadores como o p53, Ki-67, HER-2 e MMP 11, se mostram realmente promissores, necessitando de validação em estudos prospectivos com grande coorte.

A perda da adesão celular é sabidamente um gatilho no processo de progressão tumoral, resultando em tumores invasivos e pouco diferenciados (JEANES et al. 2008). A diminuição na expressão de E-caderina mostrou ser um fator prognóstico independente em CUB (SHARIAT et al. 2001; ERDEMIR et al. 2007; MURAMAKI et al. 2010). Estudos para analisar a expressão de E-caderina como fator prognóstico em CUTS foram feitos com casuística pequena e tiveram resultados até então conflitantes (NAKANISHI et al. 1997; FROMONT et al. 2005; MURAMAKI et al. 2011; STOJNEV et al. 2015). Isso nos motivou a desenvolver um estudo multi-institucional com colaboração internacional envolvendo sete instituições de referência, patologia centralizada e com grande coorte no sentido de investigar o real papel da E-caderina como fator prognóstico em CUTS. Metade da nossa casuística tinha diminuição na expressão de E-caderina (52%). Nós conseguimos demonstrar que esses pacientes com diminuição na expressão de E-caderina mais frequentemente apresentavam tumores com características biologicamente mais agressivas, como estágio patológico mais avançado, alto grau histológico, metástases linfonodais, ILV, presença concomitante de carcinoma *in situ*, multifocalidade, necrose tumoral e arquitetura tumoral séssil. O interessante é que todas essas características patológicas já foram demonstradas como sendo independentemente associadas a uma pior sobrevida em CUTS. Esta associação está de acordo com o papel biológico da E-caderina como uma glicoproteína dependente de cálcio essencial para manter a integridade tecidual. A perda da adesão celular resulta na liberação de células cancerosas da lesão primária e facilita o processo de invasão.

Nós também avaliamos a E-caderina como marcador de sobrevida em CUTS. Até então, um estudo com apenas 62 pacientes diagnosticados com CUTS e submetidos à NUR conseguiu identificar uma associação entre a diminuição na expressão de E-caderina e SG e SLD na análise multivariada (FROMONT et al. 2005). Na nossa casuística com 678 pacientes, nós confirmamos que a diminuição na expressão de E-caderina esteve associada a um aumento no risco de recorrência e morte câncer-específica. Entretanto, quando analisamos juntamente com outros fatores prognósticos conhecidos na análise multivariada, a diminuição na expressão de E-caderina perde seu valor como fator prognóstico independente, tendo, assim, sua utilidade clínica limitada.

As vias patogénéticas relacionadas à E-caderina ainda estão sendo desvendadas em CUTS. A regulação da E-caderina está associada a muitos outros marcadores (como snail, e marcadores associados a TEM como N-caderina, cateninas e MMPs), e uma análise combinada poderia ajudar a melhor caracterizar essas diferentes vias patogénéticas envolvidas na agressividade tumoral, assim como seu papel na evolução desses pacientes. Infelizmente, a combinação ideal de marcadores de TEM em CUTS ainda é desconhecida.

Obviamente, algumas limitações do nosso estudo devem ser reiteradas. Inicialmente, trata-se de um estudo retrospectivo. Além do mais, a técnica IHQ utilizada pode ser de difícil reprodutibilidade devido às escolhas dos anticorpos, procedimentos de manejo dos espécimes, demandas técnicas e protocolos de avaliação da expressão do marcador. A definição da diminuição da expressão E-caderina foi feita baseada em estudos prévios em CUB (BYRNE et al. 2001; MURAMAKI et al. 2010) e um estudo em CUTS (MURAMAKI et al. 2010), e

talvez limites diferentes poderiam ter trazido também resultados diferentes. Mesmo assim, técnicas modernas de construção de TMA e protocolos foram utilizados para reação imuno-histoquímica com sistema automatizado de avaliação, no sentido de diminuir essas limitações. Nossa patologia foi centralizada e avaliada por patologistas geniturinários cegos para os desfechos clínicos.

Do ponto de vista biológico, nós confirmamos em um estudo com grande coorte que a diminuição na expressão de E-caderina esteve realmente associada com características patológicas agressivas em pacientes com CUTS. Do ponto de vista clínico, o papel da expressão de E-caderina como fator prognóstico independente de sobrevida se mostra limitado, quando outros fatores preditivos são levados em consideração. Obviamente, o papel do nosso estudo é levantar hipóteses e não determinar condutas clínicas. Nossos achados merecem e devem obrigatoriamente ser validados em caráter prospectivo.

5 CONCLUSÕES

- 1 A diminuição na expressão de E-caderina esteve significativamente associada a diversos fatores patológicos característicos de doença agressiva.
- 2 A diminuição na expressão de E-caderina esteve associada a uma chance maior de recorrência e morte câncer-específica na análise univariada, porém não foi um fator prognóstico independente de sobrevida na análise multivariada.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboumohamed AA, Krane LS, Hemal AK. Oncologic outcomes following robot-assisted laparoscopic nephroureterectomy with bladder cuff excision for upper tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2015; 194:1561-6.

Abufaraj M, Moschini M, Soria F, et al. Prognostic role of expression of N-cadherin in patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study. **World J Urol** 2016 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00345-016-1968-2.

Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update. **Eur Urol** 2011; 59:997-1008.

Barrow P, Khan M, Lalloo F, Evans DG, Hill J. Systematic review of the impact of registration and screening on colorectal cancer incidence and mortality in familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. **Br J Surg** 2013; 100:1719-31.

Bogdanovic LJ, Radojevic-Skodric S, Lazic M, et al. Immunohistochemical detection of cyclin E in transitional cell carcinoma. **J BUON** 2011; 16:727-32.

Bolenz C, Fernández MI, Trojan L, et al. Lymphovascular invasion and pathologic tumor stage are significant outcome predictors for patients with upper tract urothelial carcinoma. **Urology** 2008; 72:364-9.

Burger M, Catto J, van Oers J, et al. Mutation of the FGFR3 oncogene is an independent and favorable prognostic factor for tumor-specific survival in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **Verh Dtsch Ges Pathol** 2006; 90:244-52.

Brien JC, Shariat SF, Herman MP, et al. Preoperative hydronephrosis, ureteroscopic biopsy grade and urinary cytology can improve prediction of advanced upper tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2010; 184:69-73.

Byrne RR, Shariat SF, Brown R, et al. E-cadherin immunostaining of bladder transitional cell carcinoma, carcinoma in situ and lymph node metastases with long-term follow-up. **J Urol** 2001; 165:1473-9.

Brown GA, Matin SF, Busby JE, et al. Ability of clinical grade to predict final pathologic stage in upper urinary tract transitional cell carcinoma: implications for therapy. **Urology** 2007; 70:252-6.

Bruins HM, Veskimäe E, Hernandez V, et al. The impact of the extent of lymphadenectomy on oncologic outcomes in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a systematic review. **Eur Urol** 2014; 66:1065-77.

Capitanio U, Shariat SF, Isbarn H, et al. Comparison of oncologic outcomes for open and laparoscopic nephroureterectomy: a multi-institutional analysis of 1249 cases. **Eur Urol** 2009; 56:1-9.

Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, et al. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:2903-10.

Chen AA, Grasso M. Is there a role for FISH in the management and surveillance of patients with upper tract transitional-cell carcinoma? **J Endourol** 2008; 22:1371-74.

Chiou HY, Chiou ST, Hsu YH, et al. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8,102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. **Am J Epidemiol** 2001; 153:411-8.

Chromecki TF, Bensalah K, Remzi M, et al. Prognostic factors for upper urinary tract urothelial carcinoma. **Nature Reviews Urology** 2011; 8:440-47.

Chromecki TF, Cha EK, Fajkovic H, et al. The impact of tumor multifocality on outcomes in patients treated with radical nephroureterectomy. **Eur Urol** 2012; 61:245-53.

Colin P, Koenig P, Ouzzane A, et al. Environmental factors involved in carcinogenesis of urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract. **BJU Int** 2009; 104:1436-40.

Cosentino M, Palou J, Gaya JM, Breda A, Rodriguez-Faba O, Villavicencio-Mavrich H. Upper urinary tract urothelial cell carcinoma: location as a predictive factor for concomitant bladder carcinoma. **World J Urol** 2013; 31:141-5.

Crivelli JJ, Xylinas E, Kluth LA, Rieken M, Rink M, Shariat SF. Effect of smoking on outcomes of urothelial carcinoma: a systematic review of the literature. **Eur Urol** 2014; 65:742-54.

Daneshmand S, Quek ML, Huffman JL. Endoscopic management of upper urinary tract transitional cell carcinoma: long-term experience. **Cancer** 2003; 98:55-60.

Ehdaie B, Chromecki TF, Lee RK, et al. Obesity adversely impacts disease specific outcomes in patients with upper tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2011; 186:66-72.

Erdemir F, Ozcan F, Kilicaslan I, Parlaktas BS, Uluocak N, Gokce O. The relationship between the expression of Ecadherin and tumor recurrence and progression in highgrade stage T1 bladder urothelial carcinoma. **Int Urol Nephrol** 2007; 39:1031-7.

Favaretto RL, Shariat SF, Chade DC, et al. Comparison between laparoscopic and open radical nephroureterectomy in a contemporary group of patients: are recurrence and disease-specific survival associated with surgical technique? **Eur Urol** 2010a; 58:645-51.

Favaretto RL, Shariat SF, Chade DC, et al. The effect of tumor location on prognosis in patients treated with radical nephroureterectomy at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. **Eur Urol** 2010b; 58:574-80

Favaretto RL, Shariat SF, Savage C, et al. Combining imaging and ureteroscopy variables in a preoperative multivariable model for prediction of muscle-invasive and non-organ confined disease in patients with upper tract urothelial carcinoma. **BJU Int** 2012; 109:77-82.

Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. **J Urol** 2002; 168:2395-400.

Fritsche HM, Novara G, Burger M, et al. Macroscopic sessile tumor architecture is a pathologic feature of biologically aggressive upper tract urothelial carcinoma. **Urol Oncol** 2012; 30:666-72.

Fritz GA, Schoellnast H, Deutschmann HA, et al. Multiphasic multidetector-row CT (MDCT) in detection and staging of transitional cell carcinomas of the upper urinary tract. **Eur Radiol** 2006; 16:1244-52.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. **J Cell Biol** 1991; 113:173-85.

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

Fujita K, Uemura M, Yamamoto Y, et al. Preoperative risk stratification for cancer-specific survival of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma treated by nephroureterectomy. **Int J Clin Oncol** 2015; 20:156-63.

Gadzinski AJ, Roberts WW, Faerber GJ, Wolf JS Jr. Long-term outcomes of nephroureterectomy versus endoscopic management for upper tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2010; 183:2148-53.

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; 82:70-6.

Goddard JC, Sutton CD, Jones JL, O'Byrne KJ, Kockelbergh RC. Reduced thrombospondin-1 at presentation predicts disease progression in superficial bladder cancer. **Eur Urol** 2002; 42:464-8.

Gore JL, Lai J, Setodji CM, Litwin MS, Saigal CS. Mortality increases when radical cystectomy is delayed more than 12 weeks: results from a Surveillance, Epidemiology, and End Results-Medicare analysis. **Cancer** 2009; 115:988-96.

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

Green DA, Rink M, Xylinas E, et al. Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: disparate twins. **J Urol** 2013; 189:1214-21.

Grollman AP, Shibutani S, Moriya M, et al. Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:12129-34.

Hernández S, López-Knowles E, Lloreta J, et al. Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelialbladder carcinomas. **J Clin Oncol** 2006; 24:3664-71.

Hurel S, Rouprêt M, Seisen T, et al. Influence of preoperative factors on the oncologic outcome for upper urinary tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy. **World J Urol** 2015; 33:335-41.

International Collaboration of Trialists; Medical Research Council Advanced Bladder Cancer Working Party (now the National Cancer Research Institute Bladder Cancer Clinical Studies Group); European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group; Australian Bladder Cancer Study Group; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group; Finnbladder; Norwegian Bladder Cancer Study Group; Club Urologico Espanol de Tratamiento Oncologico Group, Griffiths G, Hall R, Sylvester R, Raghavan D, Parmar MK. International phase III trial assessing neoadjuvant cisplatin, methotrexate, and vinblastin chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer: long-term results of BA06 30894 trial. **J Clin Oncol** 2011; 29:2171-7.

Isbarn H, Jeldres C, Shariat SF, et al. Location of the primary tumor is not an independent predictor of cancer specific mortality in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2009; 182:2177-81.

Ito A, Shintaku I, Satoh M, et al. Prospective randomized phase II trial of a single early intravesical instillation of pirarubicin (THP) in the prevention of bladder recurrence after nephroureterectomy for upper urinary tract urothelial carcinoma: the THP Monotherapy Study Group Trial. **J Clin Oncol** 2013; 31:1422-7.

Izquierdo L, Truan D, Petit A, Gutiérrez R, Mallofré C, Alcaraz A. Adhesion molecules alpha, beta and gamma-catenin as prognostic factors of tumour progression in upper urinary tract urothelial tumours: the role of AKT-P/GSK-3beta/beta-catenin pathway. **BJU Int** 2009; 104:100-6.

Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene** 2008; 27:6920-29.

Jeldres C, Sun M, Lughezzani G, et al. Highly predictive survival nomogram after upper urinary tract urothelial carcinoma. **Cancer** 2010; 116:3774-84.

Jeong IG, Kim SH, Jeon HG, et al. Prognostic value of apoptosis-related markers in urothelial cancer of the upper urinary tract. **Hum Pathol** 2009; 40:668-77.

Joung JY, Yang SO, Jeong IG, et al. Identification of immunohistochemical factors that predict the synchronous or metachronous development of bladder tumors in patients with upper urinary tract tumors. **Urol Int** 2008; 81:306-11.

Kaag MG, O'Malley RL, O'Malley P, et al. Changes in renal function following nephroureterectomy may affect the use of perioperative chemotherapy. **Eur Urol** 2010; 58:581-7.

Kaag M, Trost L, Thompson RH, et al. Preoperative predictors of renal function decline after radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. **BJU Int** 2014; 114:674-9.

Kamijima S, Tobe T, Suyama T, et al. The prognostic value of p53, Ki-67 and matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. **Int J Urol** 2005; 12:941-7.

Karam JA, Lotan Y, Karakiewicz PI, et al. Use of combined apoptosis biomarkers for prediction of bladder cancer recurrence and mortality after radical cystectomy. **Lancet Oncol** 2007; 8:128-36.

Kikuchi E, Margulis V, Karakiewicz PI, et al. Lymphovascular invasion predicts clinical outcomes in patients with node-negative upper tract urothelial carcinoma. **J Clin Oncol** 2009; 27:612-8.

Kim M, Moon KC, Choi WS, et al. Prognostic value of systemic inflammatory responses in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. **World J Urol** 2015; 33:1439-57.

Kirton L. **Analysis of miRNA and mRNA associated with epithelial mesenchymal transition.** 2010. Available form: <URL:<http://archive.cnx.org/contents/45283c3f-c8cc-4659-94b5-d2faa9c2cf2f@2/analysis-of-mirna-and-mrna-associated-with-epithelial-mesenchymal-transition>> [2017 jan 12]

Klatte T, Seligson DB, LaRochelle J, et al. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:894-900.

Kondo T, Nakazawa H, Ito F, Hashimoto Y, Toma H, Tanabe K. Primary site and incidence of lymph node metastases in urothelial carcinoma of upper urinary tract. **Urology** 2007a; 69:265-9.

Kondo T, Nakazawa H, Ito F, Hashimoto Y, Toma H, Tanabe K. Impact of the extent of regional lymphadenectomy on the survival of patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **J Urol** 2007b; 178:1212-7.

Kondo T, Tanabe K. The role of lymph node dissection in the management of urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **Int J Clin Oncol** 2011; 16:170-8.

Kondo T, Hara I, Takagi T, et al. Template-based lymphadenectomy in urothelial carcinoma of the renal pelvis: a prospective study. **Int J Urol** 2014; 21:453-9.

Kosaka T, Kikuchi E, Mikami S, et al. Expression of snail in upper urinary tract urothelial carcinoma: prognostic significance and implications for tumor invasion. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5814-23.

Krabbe LM, Bagrodia A, Lotan Y, et al. Prospective analysis of Ki-67 as an independent predictor of oncologic outcomes in patients with high grade upper tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2014; 191:28-34.

Krabbe LM, Bagrodia A, Haddad AQ, et al. Multi-institutional validation of the predictive value of Ki-67 in patients with high grade urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **J Urol** 2015; 193:1486-93.

Ku JH, Byun SS, Jeong H, Kwak C, Kim HH, Lee SE. The role of p53 on survival of upper urinary tract urothelial carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Clin Genitourin Cancer** 2013; 11:221-8.

Langner C, Gross C, Rehak P, Ratschek M, Rüschoff J, Zigeuner R. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract transitional cell carcinoma: systematic analysis applying tissue microarray technique. **Urology** 2005; 65:176-80.

Langner C, Hutterer G, Chromecki T, Rehak P, Zigeuner R. Patterns of invasion and histological growth as prognostic indicators in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **Virchows Arch** 2006a; 448:604-11.

Langner C, Hutterer G, Chromecki T, Leibl S, Rehak P, Zigeuner R. Tumor necrosis as prognostic indicator in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. **J Urol** 2006b; 176:910-3.

Lee SE, Hong SK, Han BK, et al. Prognostic significance of tumor necrosis in primary transitional cell carcinoma of upper urinary tract. **Jpn J Clin Oncol** 2007; 37:49-55.

Leibl S, Zigeuner R, Hutterer G, Chromecki T, Rehak P, Langner C. EGFR expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease progression and metaplastic morphology. **APMIS** 2008; 116:27-32.

Lehmann J, Suttman H, Kovac I, et al. Transitional cell carcinoma of the ureter: prognostic factors influencing progression and survival. **Eur Urol** 2007; 51:1281-8.

Leow JJ, Martin-Doyle W, Fay AP, Choueiri TK, Chang SL, Bellmunt J. A systematic review and meta-analysis of adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for upper tract urothelial carcinoma. **Eur Urol** 2014; 66:529-41.

Li WM, Li CC, Ke HL, Wu WJ, Huang CN, Huang CH. The prognostic predictors of primary ureteral transitional cell carcinoma after radical nephroureterectomy. **J Urol** 2009; 182:451-8.

Li WM, Shen JT, Li CC, et al. Oncologic outcomes following three different approaches to the distal ureter and bladder cuff in nephroureterectomy for primary upper urinary tract urothelial carcinoma. **Eur Urol** 2010; 57:963-9.

Li WM, Wei YC, Huang CN, et al. Matrix metalloproteinase-11 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in urothelial carcinomas. **J Surg Oncol** 2016; 113:700-7.

Liang PI, Li WM, Wang YH, et al. HuR cytoplasmic expression is associated with increased cyclin a expression and poor outcome with upper urinary tract urothelial carcinoma. **BMC Cancer** 2012; 12:611.

Liu JY, Li YH, Zhang ZL, et al. Age-specific effect of gender on upper tract urothelial carcinoma outcomes. **Med Oncol** 2013; 30:640.

Lokeshwar BL, Seizer MG, Block NL, et al. Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate explant cultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinases secretion by malignant tissues. **Cancer Res** 1993; 53:4493-8.

Long X, Zu X, Li Y, et al. Epidermal growth factor receptor and Ki-67 as predictive biomarkers identify patients who will be more sensitive to intravesical instillations for the prevention of bladder cancer recurrence after radical nephroureterectomy. **PLoS One** 2016; 11:e0166884.

Lopez-Beltran A, Sauter G, Gasser T, et al. **Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon, France: IARC Press; 2004. Tumours of the urinary system; p.86. (World Health Organization classification of tumors)

Lucca I, Klatte T, Fajkovic H, de Martino M, Shariat SF. Gender differences in incidence and outcomes of urothelial and kidney cancer. **Nat Rev Urol** 2015; 12:585-92.

Lughezzani G, Jeldres C, Isbarn H, et al. Nephroureterectomy and segmental ureterectomy in the treatment of invasive upper tract urothelial carcinoma: a population-based study of 2299 patients. **Eur J Cancer** 2009; 45:3291-7.

Lughezzani G, Jeldres C, Isbarn H, et al. A critical appraisal of the value of lymph node dissection at nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. **Urology** 2010; 75:118-24.

Lughezzani G, Burger M, Margulis V, et al. Prognostic factors in upper urinary tract urothelial carcinomas: a comprehensive review of the current literature. **Eur Urol** 2012; 62:100-14.

Margulis V, Shariat SF, Matin SF, et al. Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. **Cancer** 2009; 115:1224-33.

Margulis V, Youssef RF, Karakiewicz PI, et al. Preoperative multivariable prognostic model for prediction of nonorgan confined urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **J Urol** 2010; 184:453-8.

Martinez-Salamanca JJ, Shariat SF, Rodriguez JC, et al. Prognostic role of ECOG performance status in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract: an international study. **BJU Int.** 2012; 109:1155-61.

Mathieu R, Klatte T, Margulis V, et al. Survivin is not an independent prognostic factor for patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study. **Urol Oncol** 2015; 33:495.e15-22.

Mathieu R, Vartolomei MD, Mbeutcha A, et al. Urothelial cancer of the upper urinary tract: emerging biomarkers and integrative models for risk stratification. **Minerva Urol Nefrol** 2016; 68:381-95.

Messer J, Shariat SF, Brien JC, et al. Urinary cytology has a poor performance for predicting invasive or high-grade upper-tract urothelial carcinoma. **BJU Int** 2011; 108:701-5.

Mian C, Mazzoleni G, Vikoler S, et al. Fluorescence in situ hybridisation in the diagnosis of upper urinary tract tumours. **Eur Urol** 2010; 58:288-92.

Miller DC, Schonlau M, Litwin MS, Lai J, Saigal CS. Renal and cardiovascular morbidity after partial or radical nephrectomy. **Cancer** 2008; 112:511-20.

Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 receptor in breast cancer: pathophysiology, clinical use, and new advances in therapy. **Chemother Res Pract** 2012; 2012:743193.

Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. **Urology** 2004; 63:602-8.

Miyata Y, Watanabe S, Kanetake H, Sakai H. Thrombospondin-1-derived 4N1K peptide expression is negatively associated with malignant aggressiveness and prognosis in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **BMC Cancer** 2012; 12:372.

Miyazaki Y, Kosaka T, Mikami S, et al. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. **Clin Cancer Res** 2012; 18:4145-53.

Mork M, Hubosky SG, Rouprêt M, et al. Lynch Syndrome: a primer for urologists and panel recommendations. **J Urol** 2015; 194:21-9.

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2530-40.

Mullerad M, Russo P, Golijanin D, et al. Bladder cancer as a prognostic factor for upper tract transitional cell carcinoma. **J Urol** 2004; 172:2177-81.

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

Muramaki M, Miyake H, Terakawa T, Kumano M, Sakai I, Fujisawa M. Expression profile of E-cadherin and N-cadherin in non-muscle invasive bladder cancer as a novel predictor of intravesical recurrence following transurethral resection. **Urol Oncol** 2010; 30:161-6.

Muramaki M, Miyake H, Terakawa T, Kusuda Y, Fujisawa M. Expression profile of e-cadherin and n-cadherin in urothelial carcinoma of the upper urinary tract is associated with disease recurrence in patients undergoing nephroureterectomy. **Urology** 2011; 78:1443e7-e12.

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

Nakanishi K, Kawai T, Sato H, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. **Hum Pathol** 2000; 31:193-200.

Nakanishi K, Hiroi S, Tominaga S, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha protein predicts survival in patients with transitional cellcarcinoma of the upper urinary tract. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2583-90.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Clinical guidelines in oncology. Bladder cancer. Version 2.2017-February 15. 2017.** Available from: URL:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp> [2017 mar 1].

Netto GJ. Molecular biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder: are we there yet? **Nat Rev Urol** 2011; 9:41-51.

Ng CK, Shariat SF, Lucas SM, et al. Does the presence of hydronephrosis on preoperative axial CT imaging predict worse outcomes for patients undergoing nephroureterectomy for upper-tract urothelial carcinoma? **Urol Oncol** 2011; 29:27-32.

Novara G, De Marco V, Gottardo F, et al. Independent predictors of cancer-specific survival in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: multi-institutional dataset from 3 European centers. **Cancer** 2007; 110:1715-22.

Novara G, Matsumoto K, Kassouf W, et al. Prognostic role of lymphovascular invasion in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract: an international validation study. **Eur Urol** 2010; 57:1064-71.

O'Brien T, Ray E, Singh R, Coker B, Beard R. Prevention of bladder tumours after nephroureterectomy for primary upper urinary tract urothelial carcinoma: a prospective, multicentre, randomised clinical trial of a single postoperative intravesical dose of mitomycin C (the ODMIT-C Trial). **Eur Urol** 2011; 60:703-10.

Ohtsuka Y, Kawakami S, Fujii Y, et al. Loss of uroplakin III expression is associated with a poor prognosis in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract. **BJU Int** 2006; 97:1322-6.

Ong AM, Bhayani SB, Pavlovich CP. Trocar site recurrence after laparoscopic nephroureterectomy. **J Urol** 2003; 170:1301.

Otto W, Shariat SF, Fritsche HM, et al. Concomitant carcinoma in situ as an independent prognostic parameter for recurrence and survival in upper tract urothelial carcinoma: a multicenter analysis of 772 patients. **World J Urol** 2011; 29:487-94.

Ouzzane A, Colin P, Xylinas E, et al. Ureteral and multifocal tumours have worse prognosis than renal pelvic tumours in urothelial carcinoma of the upper urinary tract treated by nephroureterectomy. **Eur Urol** 2011; 60:1258-65.

Palou J, Piovesan LF, Huguet J, Salvador J, Vicente J, Villavicencio H. Percutaneous nephroscopic management of upper urinary tract transitional cell carcinoma: recurrence and long-term followup. **J Urol** 2004; 172:66-9.

Park J, Ha SH, Min GE, et al. The protective role of renal parenchyma as a barrier to local tumor spread of upper tract transitional cell carcinoma and its impact on patient survival. **J Urol** 2009; 182:894-9.

Perry JK, Lins RJ, Lobie PE, Mitchell MD. Regulation of invasive growth: similar epigenetic mechanisms underpin tumour progression and implantation in human pregnancy. **Clin Sci (Lond)** 2009; 118:451-7.

Phé V, Cussenot O, Bitker MO, Rouprêt M. Does the surgical technique for management of the distal ureter influence the outcome after nephroureterectomy? **BJU Int** 2011; 108:130-8.

Pieras E, Frontera G, Ruiz X, Vicens A, Ozonas M, Pizá P. Concomitant carcinoma in situ and tumour size are prognostic factors for bladder recurrence after nephroureterectomy for upper tract transitional cell carcinoma. **BJU Int** 2010; 106:1319-23.

Raman JD, Ng CK, Scherr DS, et al. Impact of tumor location on prognosis for patients with upper tract urothelial carcinoma managed by radical nephroureterectomy. **Eur Urol** 2010; 57:1072-9.

Raman JD, Messer J, Sielatycki JA, Hollenbeak CS. Incidence and survival of patients with carcinoma of the ureter and renal pelvis in the USA 1973 – 2005. **BJU Int** 2011a; 107:1059-64.

Raman JD, Shariat SF, Karakiewicz PI, et al. Does preoperative symptom classification impact prognosis in patients with clinically localized upper-tract urothelial carcinoma managed by radical nephroureterectomy? **Urol Oncol** 2011b; 29:716-23.

Reis ST, Leite KR, Mosconi Neto A, et al. Immune expression of E-cadherin and α , β and γ -Catenin adhesion molecules and prognosis for upper urinary tract urothelial carcinomas. **Int Braz J Urol** 2012; 38:466-73.

Remzi M, Haitel A, Margulis V, et al. Tumour architecture is an independent predictor of outcomes after nephroureterectomy: a multi-institutional analysis of 1363 patients. **BJU Int** 2009; 103:307-11.

Rey A, Lara PC, Redondo E, Valdés E, Apolinario R. Overexpression of p53 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. Relation to tumor proliferation and survival. **Cancer** 1997; 79:2178-85.

Reynolds JP, Voss JS, Kipp BR, et al. Comparison of urine cytology and fluorescence in situ hybridization in upper urothelial tract samples. **Cancer Cytopathol** 2014; 122:459-67.

Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, et al. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. **Mol Carcinog** 2002; 34:187-98.

Rink M, Robinson BD, Green DA, et al. Impact of histological variants on clinical outcomes of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2012; 188:398-404.

Rojas CP, Castle SM, Llanos CA, et al. Low biopsy volume in ureteroscopy does not affect tumor biopsy grading in upper tract urothelial carcinoma. **Urol Oncol** 2013; 31:1696-700.

Roscigno M, Shariat SF, Margulis V, et al. Impact of lymph node dissection on cancer specific survival in patients with upper tract urothelial carcinoma treated with radical nephroureterectomy. **J Urol** 2009; 181:2482-9.

Rouprêt M, Fromont G, Azzouzi AR, et al. Microsatellite instability as predictor of survival in patients with invasive upper urinary tract transitional cell carcinoma. **Urology** 2005; 65:1233-7.

Rouprêt M, Smyth G, Irani J, et al. Oncological risk of laparoscopic surgery in urothelial carcinomas. **World J Urol** 2009; 27:81-8.

Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, et al. European Association of Urology Guidelines on upper urinary tract urothelial cell carcinoma: 2015 update. **Eur Urol** 2015; 68:868-79.

Saika T, Nishiguchi J, Tsushima T, et al. Comparative study of ureteral stripping versus open ureterectomy for nephroureterectomy in patients with transitional carcinoma of the renal pelvis. **Urology** 2004; 63:848-52.

Saito K, Kawakami S, Ohtsuka Y, et al. The impact of preoperative serum C-reactive protein on the prognosis of patients with upper urinary tracturothelial carcinoma treated surgically. **BJU Int** 2007; 100:269-73.

Sarsik B, Doganavsargil B, Simsir A, et al. P21 and p27 immunoexpression in upper urinary tract urothelial carcinomas. **Pathol Oncol Res** 2016; 22:839-45.

Sasaki Y, Sasaki T, Kawai T, et al. HER2 protein overexpression and gene amplification in upper urinary tract urothelial carcinoma-an analysis of 171 patients. **Int J Clin Exp Pathol** 2014; 7:699-708.

Seisen T, Granger B, Colin P, et al. A systematic review and meta-analysis of clinicopathologic factors linked to intravesical recurrence after radical nephroureterectomy to treat upper tract urothelial carcinoma. **Eur Urol** 2015; 67:1122-33.

Seisen T, Peyronnet B, Dominguez-Escrig JL, et al. Oncologic outcomes of kidney-sparing surgery versus radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma: a systematic review by the eau non-muscle invasive bladder cancer guidelines panel. **Eur Urol** 2016; 70:1052-68.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. **CA Cancer J Clin** 2012; 62:10-29.

Silberstein JL, Power NE, Savage C, et al. Renal function and oncologic outcomes of parenchymal sparing ureteral resection versus radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. **J Urol** 2012; 187:429-34.

Simone G, Papalia R, Guaglianone S, et al. Laparoscopic versus open nephroureterectomy: perioperative and oncologic outcomes from a randomised prospective study. **Eur Urol** 2009a; 56:520-6.

Simone G, Papalia R, Loreto A, et al. Independent prognostic value of tumour diameter and tumour necrosis in upper urinary tract urothelial carcinoma. **BJU Int** 2009b; 103:1052-7.

Shariat SF, Pahlavan S, Baseman AG, et al. E-cadherin expression predicts clinical outcome in carcinoma in situ of the urinary bladder. **Urology** 2001; 57:60-5.

Shariat SF, Ashfaq R, Sagalowsky AI, Lotan Y. Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. **J Urol** 2007; 177:481-7.

Shariat SF, Karakiewicz PI, Ashfaq R. Multiple biomarkers improve prediction of bladder cancer recurrence and mortality in patients undergoing cystectomy. **Cancer** 2008; 112:315-25.

Shariat SF, Godoy G, Lotan Y, et al. Advanced patient age is associated with inferior cancer-specific survival after radical nephroureterectomy. **BJU Int** 2010; 105:1672-7.

Shariat SF, Favaretto RL, Gupta A, et al. Gender differences in radical nephroureterectomy for upper tract urothelial carcinoma. **World J Urol** 2011; 29:481-6.

Sheth KR, Haddad AQ, Ashorobi OS, et al. Prognostic serum markers in patients with high-grade upper tract urothelial carcinoma. **Urol Oncol** 2016; 34:418.e9-418.e16.

Sijmons RH, Kiemeny LA, Witjes JA, Vasen HF. Urinary tract cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: risks and screening options. **J Urol** 1998; 160:466-70.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA: 2012. Pelve renal e ureter; p.268-71.

Soria F, Moschini M, Haitel A, et al. HER2 overexpression is associated with worse outcomes in patients with upper tract urothelial carcinoma (UTUC). **World J Urol** 2016 Jun 7. [Epub ahead of print]

Stojnev S, Krstić M, Velicković LJ, et al. Impact of Ki-67 and E-cadherin expression on lymphovascular invasion in upper urinary tract urothelial carcinoma. **Vojnosanit Pregl** 2015; 72:982-8.

Svatek RS, Jeldres C, Karakiewicz PI, et al. Pre-treatment biomarker levels improve the accuracy of post-prostatectomy nomogram for prediction of biochemical recurrence. **Prostate** 2009; 9:886-94.

Takahashi N, Glockner JF, Hartman RP, et al. Gadolinium enhanced magnetic resonance urography for upper urinary tract malignancy. **J Urol** 2010; 183:1330-65.

Talvensaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, et al. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressiveness in breast carcinoma. **Cancer** 1988; 83:1153-62.

Tran W, Serio AM, Raj GV, et al. Longitudinal risk of upper tract recurrence following radical cystectomy for urothelial cancer and the potential implications for long-term surveillance. **J Urol** 2008; 179:96-100.

Tsai YS, Tzai TS, Chow NH, Wu CL. Frequency and clinicopathologic correlates of ErbB1, ErbB2, and ErbB3 immunoreactivity in urothelial tumors of upper urinary tract. **Urology** 2005; 66:1197-202.

van Oers JM, Zwarthoff EC, Rehman I, et al. FGFR3 mutations indicate better survival in invasive upper urinary tract and bladder tumours. **Eur Urol** 2009; 55:650-7.

Vershasselt-Crinquette M, Colin P, Ouzzane A, et al. Assessment of human epidermal growth factor receptor 2 status in urothelial carcinoma of the upper urinary tract: a study using dual-color in situ hybridization and immunohistochemistry. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2012; 20:363-6.

Vieweg J, Gschwend JE, Herr HW, Fair WR. Pelvic lymph node dissection can be curative in patients with node positive bladder cancer. **J Urol** 1999; 161:449-54.

Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. **Nat Rev Clin Oncol** 2010; 7:153-62.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. **Science** 2013; 339:1546-58.

Waldert M, Karakiewicz PI, Raman JD, et al. A delay in radical nephroureterectomy can lead to upstaging. **BJU Int** 2010; 105:812-7.

Walton TJ, Novara G, Matsumoto K, et al. Oncological outcomes after laparoscopic and open radical nephroureterectomy: results from an international cohort. **BJU Int** 2011; 108:406-12.

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

Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M. Cadherin switching. **J Cell Sci** 2008; 121:727-35.

Xylinas E, Kluth L, Passoni N, et al. Prediction of intravesical recurrence after radical nephroureterectomy: development of a clinical decision-making tool. **Eur Urol** 2014; 65:650-8.

Xu AD, Ng CS, Kamat A, et al. Significance of upper urinary tract urothelial thickening and filling defect seen on MDCT urography in patients with a history of urothelial neoplasms. **AJR AM J Roentgenol** 2010; 195:959-65.

Xu C, Zeng Q, Hou J, et al. Utility of a modality combining FISH and cytology in upper tract urothelial carcinoma detection in voided urine samples of Chinese patients. **Urology** 2011; 77:636-41.

Yates DR, Catto JW. Distinct patterns and behaviour of urothelial carcinoma with respect to anatomical location: how molecular biomarkers can augment clinico-pathological predictors in upper urinary tract tumours. **World J Urol** 2013; 31:21-9.

Yeh HC, Huang CH, Yang SF, et al. Nuclear factor- κ B activation predicts an unfavourable outcome in human upper urinary tract urothelial carcinoma. **BJU Int** 2010; 106:1223-9.

Youssef RF, Shariat SF, Lotan Y, et al. Upper urinary tract urothelial carcinoma with loco-regional nodal metastases: insights from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. **BJU Int** 2011a; 108:1286-91.

Youssef RF, Shariat SF, Lotan Y, et al. Prognostic effect of urinary bladder carcinoma in situ on clinical outcome of subsequent upper tract urothelial carcinoma. **Urology** 2011b; 77:861-6.

Youssef RF, Krabbe LM, Shariat SF, et al. TALL score for prediction of oncological outcomes after radical nephroureterectomy for high-grade upper tract urothelial carcinoma. **World J Urol** 2015; 33:1965-72.

Zigeuner R, Pummer K. Urothelial carcinoma of the upper urinary tract: surgical approach and prognostic factors. **Eur Urol** 2008; 53:720-31.

Zigeuner R, Shariat SF, Margulis V, et al. Tumour necrosis is an indicator of aggressive biology in patients with urothelial carcinoma of the upperurinary tract. **Eur Urol** 2010; 57:575-81.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

A.C. Camargo Cancer Center

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 23 de setembro de 2013.

Ao
Dr. Stênio de Cássio Zequi.

Aluno: Ricardo de Lima Favaretto (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1800/13

“Avaliação imunohistoquímica da expressão de N-caderina e E-caderina no prognóstico de pacientes com carcinoma urotelial de pelve renal e ureter esporádico submetidos à nefroureterectomia radical: um estudo colaborativo internacional”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 17/09/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 16/07/2013, aprovaram a realização do projeto do estudo em referência (datado de 06 de março de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Urologia;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração Sobre Envio de Lâminas de TMA para a Universidade de Medicina de Viena – Áustria, como parte de colaboração internacional;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do pesquisador responsável na Universidade de Medicina de Viena – Áustria (Dr. Shahrokh F. Shariat).

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este primeiro centro.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Estadiamento TNM 2009 do carcinoma urotelial de pelve renal e ureter

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Ausência de evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade o tecido conectivo subepitelial
T2	Tumor invade camada muscular própria
T3	(pelve renal) Tumor invade além da camada muscular na gordura peripiélica ou parênquima renal
	(ureter) Tumor invade além da camada muscular na gordura periureteral
T4	Tumor invade órgãos adjacentes ou através do rim na gordura perinefrética
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases linfonodais regionais
N1	Metástase em um único linfonodo de 2 cm ou menor
N2	Metástase em um único linfonodo maior de 2 cm, mas não maior que 5 cm, ou múltiplos linfonodos, nenhum maior que 5 cm
N3	Metástase em linfonodo maior que 5 cm
MX	Metástases a distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Presença de metástases a distância

Fonte: Adaptado de Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. **TNM Classificação dos tumores malignos.** [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA: 2012. Pelve renal e ureter; p.268-71.

Anexo 3 - Classificação de performance/status do ECOG: Eastern Cooperative Oncologic Group Performance Status Classification.

0 – Assintomático.

1 – Sintomático, mas completamente ambulatorial.

2 – Sintomático, permanece no leito <50% do dia.

3- Sintomático, permanece > 50% do dia no leito, mas não restrito ao leito.

4 – Restrito ao leito.

5 – Morto.

Fonte: Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am J Clin Oncol** 1982; 5:649-55.

Anexo 4 – Classificação do performance/status do KPS: Karnofsky Performance Status Scale.

100% - normal, sem queixas, sem sinais de doença.

90% - capaz de atividade normal, poucos sinais ou sintomas de doença.

80% - atividade normal com alguma dificuldade, alguns sinais e sintomas.

70% - capaz de cuidar de si próprio, incapaz de atividade normal ou trabalho.

60% - necessidade de alguma ajuda, capaz de cuidar da maioria das necessidades próprias.

50% - frequentemente necessita de ajuda, necessita de atenção médica frequente.

40% - incapaz, necessita de cuidado especial e ajuda.

30% - gravemente incapaz, admissão hospitalar indicada mas sem risco de morte.

20% - muito doente, necessidade de admissão imediata e medidas de suporte ou tratamento.

10% - moribundo, rápida progressão para doença fatal.

0% - morte.

Fonte: Karnofsky DA, Burchenal JH. The Clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MacLeod CM, editor. **Evaluation of chemotherapeutic agents.** New York: Columbia Univ Press: 1949. p.196

Anexo 5 – Ficha de levantamento de dados.

Registro na patologia: _____

Gênero: (0) masculino (1) feminino

Data de nascimento: _____

Idade (anos): _____

Raça: (0) asiático (1) negro (2) branco

ASA: _____

Hematúria: (0) não (1) sim

Tabagismo: (0) não (1) sim

Histórico prévio de CUB não-músculo invasivo: (0) não (1) sim

Histórico prévio de BCG intravesical: (0) não (1) sim

Histórico prévio de ablação endoscópica de trato alto: (0) não (1) sim

Ureteroscopia/biópsia para diagnóstico: (0) não (1) sim

Data do diagnóstico: _____

Suspeita de linfonodos aumentados no exame de imagem: (0) não (1) sim

Hidronefrose no exame de imagem: (0) não (1) sim

Suspeita de invasão no exame de imagem: (0) não (1) sim

Localização da lesão no exame de imagem: (1) pelve renal (2) ureter

Citologia urinária: (0) não (1) negativa (2) positiva

Quimioterapia neoadjuvante: (0) não (1) sim

Data da cirurgia: _____

Via de acesso: (1) aberta (2) laparoscópica

Tipo de cirurgia: (1) nefroureterectomia radical (2) ureterectomia segmentar

Lateralidade da lesão: (1) direito (2) esquerdo

Duração da cirurgia: _____

Perda estimada de sangue: _____

Transfusão perioperatória: _____

Tempo de internação: _____

Creatinina pre op: _____

Clerance de creatinina pre op: _____

Creatinina pós op: _____

Clarence de creatinina pós op: _____

Localização do tumor na patologia: (1) pelve renal (2) ureter

Estádio patológico: (0) pT0 (1) pTa (2) pTis (3) pT1 (4) pT2 (5) pT3 (6) pT4

Tamanho da maior lesão: _____

Estádio linfonodal: (0) Nx (1) N0 (2) N+

Grau histológico: (1) baixo grau (2) alto grau

Cis associado: (0) não (1) sim

Focalidade: (1) unifocal (2) multifocal

Invasão linfovascular: (0) não (1) sim

Arquitetura tumoral: (1) séssil (2) papilífero

Necrose tumoral: (0) não (1) sim

Margens cirúrgicas: (0) negativa (1) positiva

Total de linfonodos retirados: _____

Total de linfonodos positivos: _____

Quimioterapia adjuvante: (0) não (1) sim

Quimioterapia de resgate: (0) não (1) sim

Radioterapia: (0) não (1) sim

Recidiva: (0) não (1) sim

Recidiva vesical: (0) não (1) sim

Data da primeira recidiva vesical: _____

Recidiva regional: (0) não (1) sim

Data da recidiva regional: _____

Recidiva contralateral: (0) não (1) sim

Data da recidiva contralateral: _____

Recidiva linfonodal: (0) não (1) sim

Data da recidiva linfonodal: _____

Metástases à distância: (0) não (1) sim

Data da detecção das metástases: _____

Data da última consulta: _____

Óbito: (0) não (1) sim

Data do óbito: _____

Status: (1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte pela doença (4)
morte por outras causas

Sobrevida global (meses): _____

Sobrevida livre de doença (meses): _____

Sobrevida câncer específica (meses): _____

Seguimento atualizado (meses): _____

Anexo 6 - Carta de submissão de artigo 1 para International Brazilian Journal of Urology

Dear Dr. Favaretto:

Your manuscript entitled "Tissue-based Molecular Markers in Upper Tract Urothelial Carcinoma and Its Prognostic Implications" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the International Braz J Urol.

Your manuscript ID is IBJU-2017-0204.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/ibju-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/ibju-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the International Braz J Urol.

Sincerely,
International Braz J Urol Editorial Office