

**IMUNOEXPRESSÃO DAS TETRASPANINAS  
(CD9 E UPIII) NO CARCINOMA  
UROTELIAL DE BEXIGA**

**GILCY RAYMUNDO DAMM**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**Co-Orientadora: Dra Luciana Schultz Amorim**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Damm, Gilcy Raymundo

**Imunoexpressão das tetraspaninas (CD9 E UPIII) no carcinoma urotelial de bexiga** / Gilcy Raymundo Damm - São Paulo, 2019.

52p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Neoplasias da Bexiga Urinária/patologia/Urinary Bladder Neoplasms/Pathology. 2. Progressão da Doença/Disease Progression. 3. Sobrevida/Survival. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Tetraspaninas/Tetraspanins. 6. Estudos Retrospectivos/Retrospective Studies. 7. Biomarcadores Tumorais/Biomarkers, Tumor

A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí?  
Nós devemos ter persistência e  
acima de tudo confiança em nós mesmos.  
Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa,  
e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada

**Marie Curie**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tese ao meu pai, Thieres Cydiney Damm, o grande sonhador e idealizador de toda esta trajetória, meu companheiro que esteve incansavelmente ao meu lado e nunca desistiu de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço inicialmente à contribuição do Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, meu orientador, e à participação ativa da minha co-orientadora Dra. Luciana Schultz, sem deixar de ressaltar a persistência e a confiança de ambos depositada em mim e no trabalho.

Estendo este a todos funcionários da pós-graduação, principalmente à coordenadora Ana Maria Kuninari e a Luciana Pitombeira (Secretaria), bem como a todo departamento de Anatomia Patológica, incluindo-se aqui os integrantes do arquivo.

Agradeço também à Suely Francisco, pelo seu auxílio na revisão e diagramação desta tese, ao Severino (TMA), e ainda, ao Dr. Samuel Spagnul, pela coleta de dados clínicos, aos Dr. Ivan Neves, Suely Nonogaki, Juliano Jampietro e Marina Rezende, pela parte de padronização de anticorpos.

Não posso deixar de mencionar também todos os pacientes que formaram nossa coorte. E a FAPESP que formentou esse trabalho.

## RESUMO

Damm GR. **Imunoexpressão das tetraspaninas (CD9 E UPIII) no carcinoma urotelial de bexiga**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução:** O carcinoma urotelial da bexiga é uma doença de alta incidência e letalidade. Recentemente, tem sido caracterizado em subtipos moleculares, com diferenças prognósticas e de resposta terapêutica. As tetraspaninas estão implicadas na adesão celular e sinalização intercelular, interferindo diretamente em fenômenos como a morfogênese dos tecidos e migração. Uma vez que os subtipos moleculares luminal e basal correspondem, respectivamente, a fenótipos celulares urotelial bem diferenciado e de reserva basal, é possível que a expressão das tetraspaninas acompanhe esse racional, o que traria possibilidade de integração no cenário clínico.

**Metodologia:** Amostras de 88 pacientes operados (cistectomia radical) por carcinoma urotelial, preservadas em parafina, foram organizadas em TMA ou cortes inteiros, submetidos a imuno-histoquímica. As reações foram analisadas por microscopia ótica convencional e acessadas quanto à intensidade de expressão - negativo, fraco e forte (escore subjetivo) e extensão de expressão – negativo, focal e difuso (baseado na porcentagem das células positivas, em cortes de 1-50%; >50%). Os tumores foram classificados em Luminal, Basal e Sem tipo definido, a partir da expressão imuno-histoquímica de GATA3, CK5/6 e CK14. A expressão citoplasmática das tetraspaninas (CD9 e UPIII) foi avaliada em tecidos tumoral e urotelial não neoplásico pareado, e correlacionadas com parâmetros patológicos e clínicos.

**Resultados:** A idade média foi de 66.9 anos, com relação H:M de 2:1 e 72% de tabagistas ou ex-tabagistas. A maior parte (62%) das cirúrgicas foram indicadas por doença músculo-invasiva já ao diagnóstico e o restante por doença não músculo-invasiva extensa/recorrente ou progredida para carcinoma músculo invasor, sendo o estadiamento final na cistectomia 14% <pT2, 21% pT2 e 65% pT3+. A perda de CD9 e expressão citoplasmática (anômala) de UPIII foram padrões particulares das amostras neoplásicas, com medianas menores e maiores, respectivamente, em

relação aos controles não neoplásicos. Nas amostras malignas, o único parâmetro clínico significativamente associado à expressão proteica foi o sexo feminino e a perda completa da expressão de CD9. Nas amostras benignas, a alta expressão de CD9 esteve relacionada à ulceração do tumor. Apesar de não haver associação significativa com nenhum dos parâmetros patológicos avaliados, notou-se que a perda completa de CD9 (n=7) foi exclusiva em tumores não-órgão confinados, a maioria (6/7) não-papilíferos. Cinco/7 casos negativos para UPIII também eram pT3-pT4, porém, em contrapartida, foram assim também estadiados todos os casos com intensidade forte para UPIII (n=9). Houve correlação positiva entre a porcentagem de diferenciação escamosa e a intensidade de expressão de CD9 (p=0,006) e UPIII (p=0,201). Apesar destes achados, não houve associação dos marcadores com a categorização dos subtipos moleculares. Conclusões: Nosso estudo mostrou associações entre a expressão das tetraspaninas estudadas e parâmetros morfológicos relacionados aos subtipos moleculares, como morfologia papilífera e diferenciação escamosa. Apesar destes achados, não houve associação significativa com os subtipos moleculares classificados por imuno-histoquímica. O melhor entendimento da dinâmica das tetraspaninas em tecidos uroteliais neoplásicos e não neoplásicos, e seu papel no processo de diferenciação, poderá propiciar o desenvolvimento de estratégias para seu controle terapêutico na progressão do carcinoma, eventualmente em paralelo às estratégias relacionadas aos subtipos moleculares.

**Descritores:** Neoplasias da Bexiga Urinária/patologia. Progressão da Doença. Sobrevida. Imuno-Histoquímica. Tetraspaninas. Estudos Retrospectivos. Biomarcadores Tumorais.

## SUMMARY

Damm GR. **[Immunoexpression of tetraspanin (CD9 e UPIII) in bladder urothelial carcinoma]**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

**Introduction:** Urothelial carcinoma of the bladder is a disease with high incidences and lethality. It has recently been characterized in molecular subtypes, with differences regarding prognosis and response to treatment. Tetraspanins are implicated in cell adhesion and intercellular signaling, directly interfering in phenomena such as tissue morphogenesis and migration. Considering that luminal and basal molecular subtypes correspond, respectively, to well differentiated urothelial and basal reserve cell phenotypes, it is possible that tetraspanin expression may follow this rationale, which could have potential to integration into the clinical scenario. **Methodology:** Paraffin-preserved samples from 88 patients submitted to radical cystectomy for urothelial carcinoma were organized into TMAs or whole sections, labeled with immunohistochemistry. Reactions were analyzed by conventional optical microscopy and assessed as to expression intensity – negative, weak or strong (subjective scoring) and extent – negative, focal or diffuse (based on percentage of positive cells in cut-offs of 1-50%; >50%). Tumors were classified into Luminal, Basal and Non-type based on immunoexpression of GATA3, CK14 and CK5/6. Cytoplasmic expression of tetraspanins was evaluated in neoplastic and non-neoplastic urothelial tissue and correlated with clinical and morphological parameters. **Results:** Mean age was 66.9 years, with M:F ratio of 2:1 and 72% smokers or ex-smokers. The majority (62%) of surgeries was indicated because of muscle-invasive disease at presentation and the rest for extensive/recurrent non muscle-invasive disease or progression to invasive carcinoma (final pathological stage at cystectomy: 14% <pT2, 21% pT2 e 65% pT3+). CD9 loss and cytoplasmic expression of UPIII were particular patterns of neoplastic samples, with lower and higher medians, respectively, relative to non neoplastic controls. In malignant samples, the only parameter significantly associated with protein expression was female sex and



complete loss of CD9. In benign samples, high CD9 expression associated with tumor ulceration. Although there was no significant association with any of the evaluated pathological parameters, complete CD9 loss (n=7) was exclusive of non organ-confined tumors, most (6/7) non-papillary. Five/7 cases with complete UPIII loss were also pT3+ but, nonetheless, all tumors with strong UPIII expression (n=9) were also staged as such. There was a positive correlation between the percentage of squamous differentiation and intensity of CD9 (p=0.006) and UPIII (p=0.201) expression. Regardless of these findings, there was no association of these markers with the categorization into molecular subtypes. Conclusions: Our study showed associations between tetraspanins expression and morphological parameters related to molecular subtypes, such as non-papillary morphology and squamous differentiation. However, there was no significant association with the molecular subtypes classified by immunohistochemistry. A better understanding of tetraspanins dynamics in neoplastic and non-neoplastic urothelial tissue, and its role in the differentiation process, may aid the development of strategies towards its therapeutical control in progression, eventually in parallel to the strategies related to molecular subtypes.

**Key-words:** Urinary Bladder Neoplasms/pathology. Disease Progression. Survival. Immunohistochemistry. Tetraspanins. Retrospective Studies. Biomarkers, Tumor

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Padrão de expressão protéica nos diferentes subtipos moleculares do carcinoma de bexiga .....	7
<b>Figura 2</b>	Modelo quartenario das Tetraspaninas .....	10
<b>Figura 3</b>	Microdomínio rico em Tetraspanina.....	11
<b>Figura 4</b>	Composição da placa de uroplaquina no urotélio .....	13
<b>Figura 5</b>	Esquema de elaboração da coorte de estudo, com critérios de inclusão e exclusão, mostrando os números finais de amostras disponíveis para cada marcador utilizado.....	17
<b>Figura 6</b>	Scanner das laminas histológicas de TMA e recortes inteiros .....	20
<b>Figura 7</b>	Imunohistoquímica de uroplaquina III .....	31
<b>Figura 8</b>	Expressão de CD9 em diferenciação escamosa .....	35
<b>Figura 9</b>	Imunohistoquímica dos diferentes subtipos moleculares do carcinoma de bexiga e tecido não neoplásico .....	36

## LISTA DE QUADROS S E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Classificação TNM/2009 dos tumores de bexiga, da União Internacional Contra o Câncer.....	2
<b>Quadro 2</b>	classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) dos tumores do Sistema Urinário e Órgãos Genitais Masculinos.....	4
<b>Quadro 3</b>	CrITÉrios de inclusão e exclusão na coorte.....	16
<b>Quadro 4</b>	Anticorpos primários (imunoistoquímica) utilizados para acessar a expressão proteica, com as respectivas referências e dados de padronizao.....	21
<b>Tabela 1</b>	Distribuio categorica dos parâmetros clínicos e evolutivos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.....	25
<b>Tabela 2</b>	Distribuio categorica dos parâmetros relacionados a diagnósticos e terapias prévias à cirurgia, na coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.....	26
<b>Tabela 3</b>	Distribuio categorica dos parâmetros anatomopatológicos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.....	28
<b>Tabela 4</b>	Média [mediana] do score de expressão (0-2+) dos marcadores CD9 e UPIII em amostras neoplásicas (maligno) e não neoplásicas (benigno) de tecido urotelial.....	30
<b>Tabela 5</b>	Categorizao n (%) do score (0-2+) de intensidade e extensão da expressão dos marcadores CD9 e UPIII em amostras neoplásicas (maligno) e não neoplásicas (benigno) de tecido urotelial.....	30

<b>Tabela 6</b>	Intensidade de expressão de CD9 e UPII em amostras neoplásicas, em relação aos parâmetros clínicos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.....	33
<b>Tabela 7</b>	Intensidade de expressão de CD9 e UPII em amostras neoplásicas, em relação aos parâmetros anatomopatológicos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia .....	34
<b>Tabela 8</b>	Média da porcentagem de diferenciação escamosa em amostras neoplásicas, de acordo com a categorização da expressão de CD9 e UPIII.....	35
<b>Tabela 9</b>	Correlação entre a intensidade da expressão dos marcadores CD9 e UPIII e o score de expressão dos marcadores relacionados ao subtipo molecular do carcinoma de bexiga, na coorte de 88 pacientes.....	37
<b>Tabela 10</b>	Distribuição categorizada da expressão de CD9 e GATA3.....	38
<b>Tabela 11</b>	Média dos scores de expressão (intensidade) de CD9 e UPIII de acordo com os subtipos moleculares do carcinoma de bexiga, caracterizados por imuno-histoquímica .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	<i>American Joint Comitee on Cancer</i>
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guerin
<b>CD</b>	Cluster Differentiation
<b>CIS</b>	Carcinoma urotelial <i>in situ</i>
<b>CNA</b>	Alteração no número de cópias
<b>CNIO</b>	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
<b>CK</b>	Citoqueratina
<b>FOX</b>	Feminizing locus on X
<b>FGFR</b>	Fribroblast Groth Factor Recptor
<b>GATA</b>	GATA binding protein 3
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HRAS</b>	Harvey rat sarcoma
<b>IHC</b>	Imunoistoquímica
<b>MDM2</b>	murine doble minute 2 protein
<b>MRP</b>	motility-related protein
<b>MI-OC</b>	Músculo-invasivo órgão confinado
<b>MI-NOC</b>	Músculo-invasivo não órgão confinado
<b>NMI</b>	Não músculo-invasivo
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saude
<b>pRB</b>	Retinoblastoma protein
<b>RTU</b>	Ressecção transuretral
<b>TMA</b>	<i>Tissue microarray</i>
<b>UAM</b>	Unidade assimétrica de membrana
<b>UP</b>	Uroplaquina

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	O carcinoma urotelial de bexiga .....	1
1.2	Integração dos aspectos moleculares e morfológicos no carcinoma urotelial ..	3
1.3	As tetraspaninas .....	9
1.4	As uroplaquinas.....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
<b>3</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>16</b>
3.1	Pacientes.....	16
3.1.1	Elaboração da coorte de estudos .....	16
3.1.2	Processamento e anotação anatomopatológica .....	17
3.1.3	Obtenção dos dados clínicos .....	18
3.2	Materiais e Métodos.....	19
3.2.1	Construção das lâminas histológicas.....	19
3.2.2	Imunoistoquímica.....	21
3.2.2.1	Reações imunoistoquímicas .....	21
3.2.2.2	Quantificação da expressão proteica.....	22
3.2.3	Análise Estatística .....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1.	Coorte.....	24
4.1.1	Caracterização clínica da coorte .....	24
4.1.2	Caracterização anatomopatológica da coorte.....	26
4.2	Expressão proteica .....	29
4.2.1	Relação da expressão de tetraspaninas com os parâmetros clínicos.....	31
4.2.2	Relação da expressão de tetraspaninas com os parâmetros patológicos.....	33
4.2.3	Relação da expressão de tetraspaninas com os subtipos moleculares .....	35

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>

### **ANEXOS**

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

**Anexo 2** Artigo publicado

**Anexo 3** Abstracts apresentados em Congressos Internacionais (USCAP  
2013 e USCAP 2015)

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 O CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA**

O carcinoma urotelial é o resultado da transformação neoplásica do epitélio de revestimento do trato urinário, podendo ocorrer da pelve renal à uretra distal. Sua etiologia associa-se à inflamação crônica e ao tabagismo. Embora unificado em uma categoria histológica, é uma doença heterogênea em relação à morfologia, vias oncogênicas, comportamento biológico e, conseqüentemente, em relação ao tratamento.

Os carcinomas não-músculo invasivos (NMI) inicialmente apresentam bom prognóstico, com perfil semelhante ao de uma doença crônica, onde a recidiva é muito frequente (50-70% dos pacientes), porém a sobrevida é ampla. Entretanto, cerca de 10-20% dos pacientes progridem para doença músculo-invasiva (MI) (REUTER 2006; CORDON-CARDO 2008), na qual a sobrevida em cinco anos é menor do que 50% (STEIN et al. 2001).

Nos tumores invasivos, a definição do nível anatômico de invasão (Quadro 1) é fundamental na determinação da conduta terapêutica. Quando há invasão da lâmina própria, porém não da camada muscular própria (pT1), têm-se preferido a ressecção endoscópica, seguida de terapia intravesical pró-inflamatória com bacilo Calmette-Guérin (onco-BCG) nos casos de alto grau. Este procedimento carrega altos índices de complicações e resistência (MARTIN e KAMAT 2010). Atualmente um importante foco neste campo tem sido a identificação das alterações relacionadas à



invasão e à progressão, visando o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para doença precoce.

**Quadro 1** - Classificação TNM/2009 dos tumores de bexiga, da União Internacional Contra o Câncer

<b>T- Tumor primário</b>	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor que invade até o tecido conjuntivo sub-epitelial
T2	Tumor que invade o músculo detrusor (camada muscular própria)
T2a	Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna)
T2b	Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido adiposo perivesical
T3a	Tumor que invade o tecido adiposo perivesical microscopicamente
T3b	Tumor que invade o tecido adiposo perivesical macroscopicamente (massa extra vesical)
T4	Tumor que invade outros órgãos pélvicos por contiguidade: próstata, útero, vagina, parede pélvica/ abdominal
T4a	Tumor que invade próstata, útero ou vagina
T4b	Tumor que invade parede pélvica ou abdominal
<b>N- Gânglios linfáticos</b>	
N1	Metástase em um único gânglio na pelve menor (hipogástrica, obturatória, íliaca externa ou pré-sacral)
N2	Metástase em múltiplos gânglios na pelve menor (hipogástrica, obturatória, íliaca externa ou pré-sacral)
<b>M- Metástase à distância</b>	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância ou em gânglio além da cadeia íliaca comum

**Fonte:** EDGE et al. (2010)

Em contrapartida, os tumores que chegam a invadir a camada muscular própria (pT2, pT3 ou pT4) representam doença agressiva, frequentemente com indicação de cirurgia radical (cistectomia ou cistoprostatectomia radical), precedida ou não de quimioterapia neoadjuvante. Atualmente, a principal opção farmacológica

neste cenário são esquemas baseados em platina. Apesar de apresentar nível I de evidência científica, com cerca de 50% de resposta, a quimioterapia neoadjuvante apresenta modestos benefícios de sobrevida em comparação com a terapia adjuvante seletiva (MORGAN et al. 2011). Assim, recentemente, a imunoterapia assumiu papel também no cenário adjuvante, sendo a primeira droga aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em novembro de 2017.

## **1.2 INTERAÇÃO DOS ASPECTOS MOLECULARES E MORFOLÓGICOS NO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA**

A relação entre a morfologia de um tumor e seu comportamento clínico é conhecida há mais de um século. Desde antes do século XIX foi observado que características como anaplasia, figuras de mitose atípica e a pouca diferenciação tumoral associavam-se com agressividade (BRODERS 1921). Entretanto, estes parâmetros só foram adotados na prática em 1970s, quando as opções terapêuticas mais abrangentes, exigiram uma melhor estratificação de risco dos pacientes. Hoje, em várias instâncias, a diferenciação de uma neoplasia tem valor prognóstico e com impacto significativo na escolha do tratamento.

Uma vez que o surgimento de uma estrutura papilar implica que o epitélio proliferante teve capacidade para interagir com o microambiente, a ponto de conceber um eixo fibrovascular, sua presença sugere um certo grau de organização. Este aspecto normalmente é associado com boa diferenciação celular e prognóstico favorável. Em câncer de bexiga, a arquitetura papilífera nunca é fisiológica e tem tal relevância, que chega a definir entidades distintas. A classificação atual (2016) da

Organização Mundial da Saúde (OMS) (Quadro 2) divide as neoplasias uroteliais em invasivas e não-invasivas. Dentre as neoplasias não-invasivas, apenas o carcinoma *in situ* (plano por definição) não contém o termo papilífero no nome (MOCH et al. 2016).

**Quadro 2** - Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)

<b>Tumores uroteliais</b>
<i>Carcinoma urotelial invasivo (e suas variantes)</i>
Em ninhos
Microcístico
Micropapilífero
Linfoepitelioma-like
Plasmocitoide/ anel de sinete/ difuso
Sarcomatoide
Células gigantes
Pouco diferenciado
Rico em lipídios
Células claras
<i>Neoplasias uroteliais não invasivas</i>
Carcinoma urotelial <i>in situ</i>
Carcinoma urotelial papilífero não invasivo, baixo grau
Carcinoma urotelial papilífero não invasivo, alto grau
Neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial de malignidade
Papiloma urotelial
Papiloma urotelial invertido
Proliferação urotelial de potencial maligno incerto
Displasia urotelial

**Fonte:** MOCH et al. (2016)

Atualmente, já é bem estabelecido que as lesões não músculo-invasivas relacionam-se primordialmente a mutações de ganho de função em oncogenes como o *H-RAS* e *FGFR3* (receptor 3 do fator de crescimento tumoral), enquanto o carcinoma *in situ* e o músculo-invasor estão associados a mutações de perda de função em supressor de tumor, como o *TP53* e *RBI*. Contudo, as lesões não invasivas

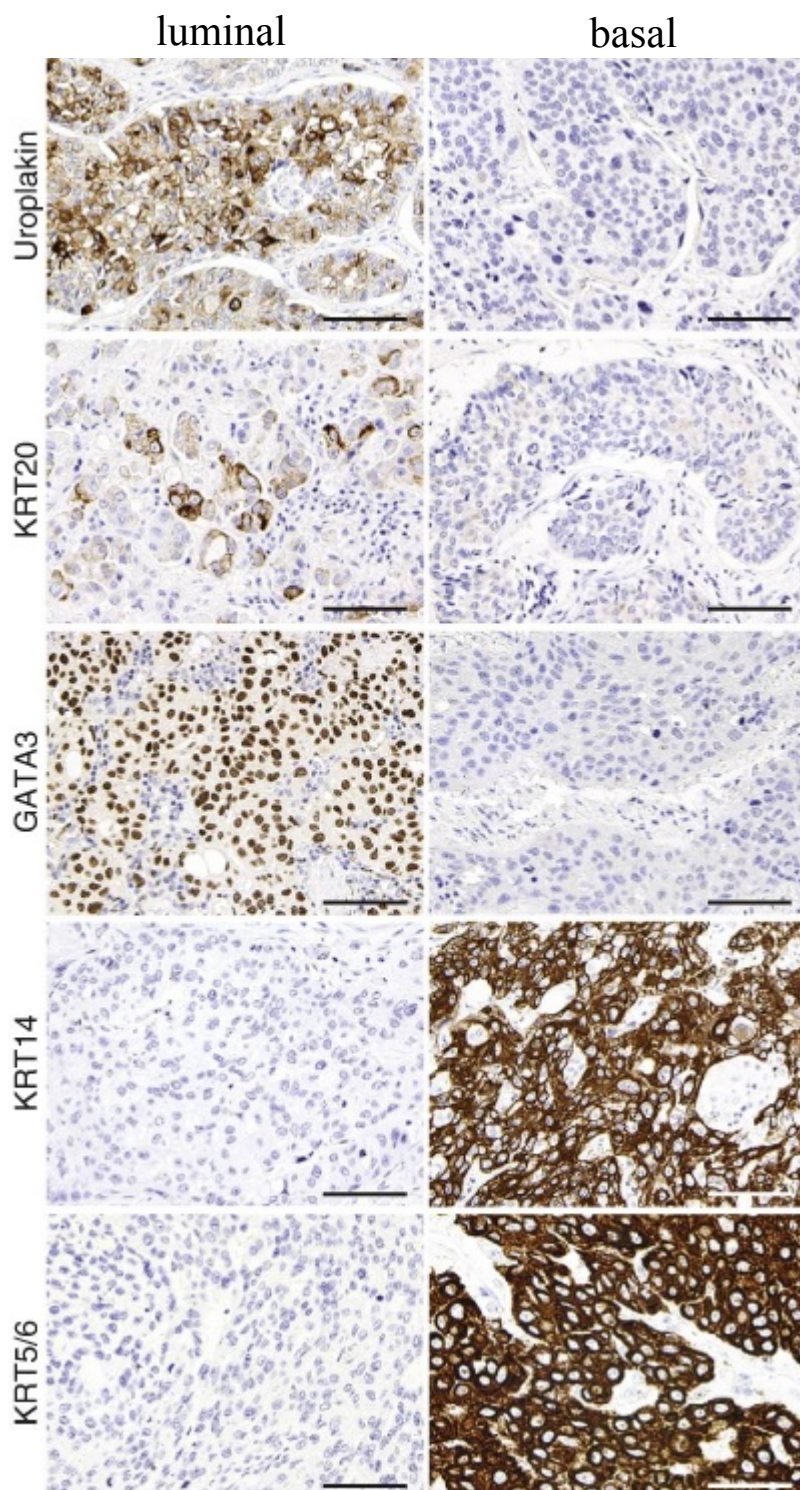
papilíferas podem progredir para doença invasiva, cujo fenômeno associa-se a aquisição de mutações em *TP53* (RODRIGUEZ PENA et al. 2017).

Em condições fisiológicas, *TP53* age como um “guardião” do DNA, inibindo a progressão do ciclo celular na transição G1-S; exerce, assim, um papel importante na estabilidade genômica das células uroteliais. Mutações no gene resultam no acúmulo de proteína p53 anômala, que apresenta boa correlação com a detecção imunohistoquímica de superexpressão nuclear de p53. Vários estudos demonstraram valor prognóstico independente deste achado para a predição de progressão e sobrevida doença específica em carcinomas de alto grau (GARCIA DEL MURO et al. 2004; TZAI et al. 2004). Ademais, a via pode ser inativada mesmo na ausência de mutação de *TP53*, por meio da superexpressão da oncoproteína codificada por *MDM2* (*murine double minute 2 protein*), que é capaz de inativar a forma selvagem de p53. Em concordância, a superexpressão de MDM2 também tem sido associada com carcinomas músculo-invasivos (MALUF et al. 2006).

Conforme nosso grupo demonstrou em publicação prévia baseada na presente coorte (SCHULTZ et al. 2016), carcinomas músculo-invasivos podem ter ou não componente papilífero, tanto à macroscopia, quanto à microscopia. Entretanto, os tumores não papilíferos são lesões mais agressivas, frequentemente ulceradas, não órgão-confinadas e associadas a componente escamoso. Estes aspectos podem refletir uma perda de comprometimento com o programa transcricional urotelial, sugerindo pouca diferenciação tumoral.

Assim, tais achados morfológicos concordam com o modelo atual de subtipagem molecular do câncer urotelial, onde o subgrupo que mais se assemelha às células com diferenciação luminal possui frequente morfologia papilífera, enquanto o

subgrupo com células mais similares ao fenótipo basal é enriquecido com componente escamoso (MCCONKEY et al. 2015). Recentemente, estudos de amplo espectro genômico (*landscape*) (Cancer Genome Atlas Research Network 2014) caracterizaram de maneira quase concomitante estes subtipos moleculares que têm sido designados de luminal e basal.



Fonte: DADHANIA et al. (2016).

**Figura 1** - Padrão de expressão proteica nos diferentes subtipos moleculares do carcinoma de bexiga

Em 2016, os três principais grupos pioneiros nestas pesquisas reuniram seus dados em um trabalho de validação e sincronização (DADHANIA et al. 2016), visando identificar assinaturas imuno-histoquímicas capazes de definir subtipos moleculares, de forma a inseri-los na prática clínica, à semelhança do que ocorre em carcinomas mamários. A expressão imuno-histoquímica de apenas dois marcadores, um luminal (GATA3) e outro basal (CK5/6) foi suficiente para identificar os subtipos moleculares de câncer urotelial com acurácia de 90%. Embora, em geral, tumores classificados como luminal baseado no perfil genômico fossem positivos para marcadores luminais (GATA3, CK20 e Uroplaquina) e tumores basais fossem positivos para marcadores basais (CK5/6 e CK14), houve sobreposição significativa dos marcadores nesses dois grupos particularmente na categoria luminal.

No mesmo ano, diante de tantos grupos investigando os subtipos moleculares de forma concomitante e com achados semelhantes, foi publicado o resultado de uma Reunião de Consenso quanto à taxonomia no *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (CNIO), em Madri, Espanha (LERNER et al. 2016). Após apresentações atualizadas por cada grupo de trabalho, um consenso foi atingido quanto à existência de tumores Basal-Escamoso-like, caracterizados pela alta expressão de CK5/6 e CK14 e expressão baixa/indetectável de GATA3 e FOX1. Um subgrupo adicional com características de diferenciação urotelial (luminal) foi reconhecido, cuja definição molecular ótima ainda está em discussão. Para outros subtipos reconhecidos, consensuou-se a necessidade de mais trabalho para determinar a robustez da subclassificação e sua definição ao nível molecular.

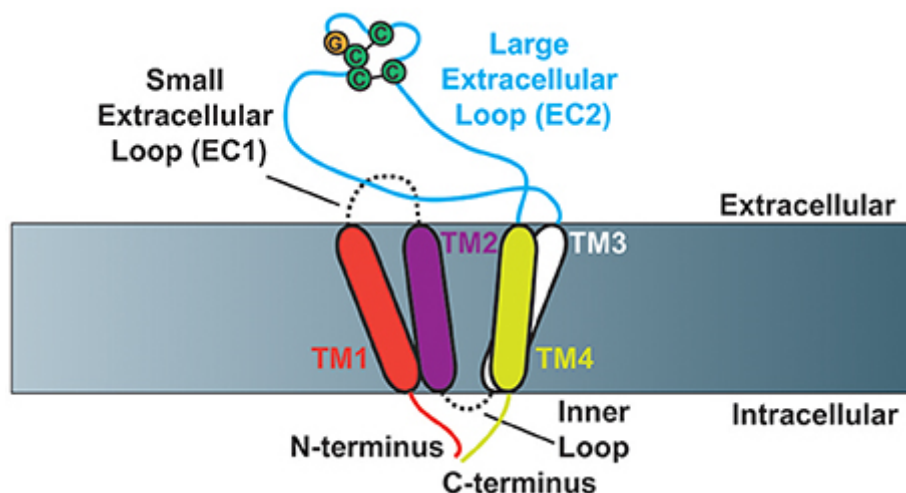
É importante salientar que os carcinomas de fenótipo basal parecem ser mais sensíveis à quimioterapia convencional baseada em cisplatina, enquanto os

carcinomas mais bem diferenciados, de fenótipo luminal, são frequentemente quimiorresistentes (CHOI et al. 2014; MCCONKEY et al. 2015). Embora o carcinoma urotelial mantenha-se com altos índices de letalidade e disponha de poucas opções terapêuticas, o cenário molecular tem sido melhor caracterizado nas últimas duas décadas. Tais avanços oferecem ferramentas moleculares potencialmente capazes de melhorar a acurácia diagnóstica e prognóstica, abrindo perspectivas animadoras para o manejo da doença e experimentação de terapias-alvo.

### **1.3 AS TETRASPANINAS**

As proteínas dessa família funcionam como uma plataforma de suporte para distribuição de proteínas em microdomínios muito organizados, relacionados a adesão/ migração celular e sinalização intercelular, interferindo diretamente em fenômenos como a diferenciação celular e morfogênese fisiológica dos tecidos (TERMINI e GILLETTE 2017). Assim, também podem estar implicadas no crescimento anormal das células, associado com neoplasia. Consistem em glicoproteínas com quatro (“tetra”) domínios hidrofóbicos transmembrânicos, delimitando duas regiões extracitoplasmáticas de mesmo tamanho, apresentando um grupamento carboxila e amina na porção intracitoplasmática, em uma pequena volta extracelular (EC1) com 20 a 28 aminoácidos e uma grande volta extracelular (EC2) com 76 a 131 aminoácidos (Figura 2) (BOUCHEIX e RUBINSTEIN 2001).





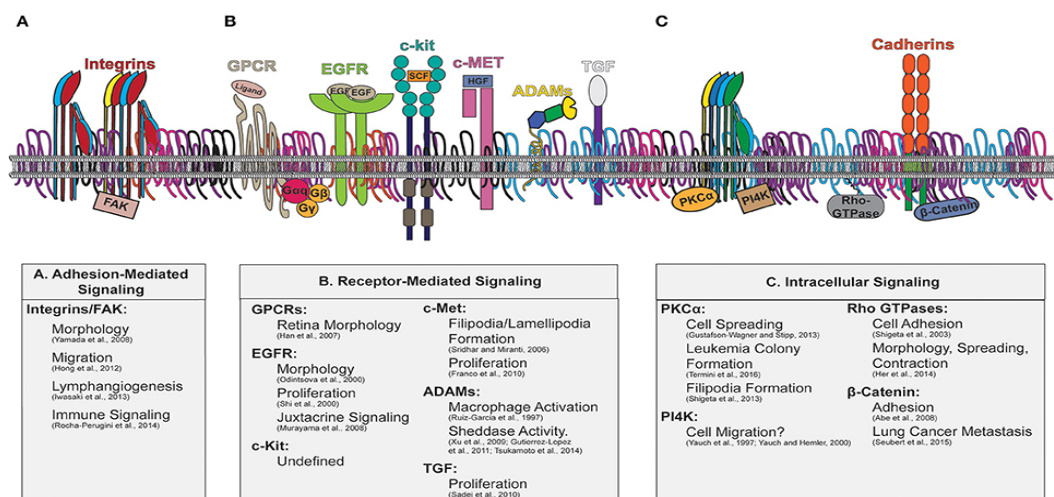
Fonte: TERMINI e GILLETTE (2017).

**Figura 2** - Modelo quaternário das Tetraspaninas. Tetraspaninas tem quatro domínios (TM1-TM4), que criam um pequeno (EC1) e um grande (EC2) loop extracelular e um pequeno loop interno. A porção N- and C-terminal das tetraspaninas são intracelulares.

Foram descobertas inicialmente, na superfície de leucócitos humanos e, atualmente, compreendem 32 membros, entre eles o CD9 e UP (Ia e Ib). A função dessas moléculas ainda não é integralmente compreendida, mas estudos mostram a capacidade da formação de uma rede em conjunto com as integrinas e outras tetraspaninas. Elas se agregam com integrinas, modulando suas funções, sendo que esta atividade depende de sua interação física. Por exemplo, em alguns tipos celulares, o CD9 modula positivamente a resposta migratória integrina-dependente.

Evidências crescentes mostram que algumas integrinas e tetraspaninas distribuem-se em microdomínios especializados das membranas plasmáticas, enriquecidos em glicosfingolípídeos e colesterol. Estes microdomínios (balsas lipídicas ou *lipid rafts*), devido à sua composição lipídica, favorecem a partição e organização de maquinarias protéicas associadas à transdução de sinais, incluindo fatores de crescimento. O funcionamento preciso desta rede de tetraspaninas e a

modificação do comportamento das células é objeto de estudo, visando entender o relacionamento das doenças com a mutação ou perda de cada tetraspanina (GOMES et al. 2005).



**Fonte:** TERMINI e GILLETTE (2017).

**Figura 3** - Microdomínio rico em Tetraspanina. A figura mostra as interações das tetraspaninas com a membrana plasmática e com as moléculas citosólicas.

As tetraspaninas são consideradas supressoras de metástase em vários tumores sólidos, sendo que a baixa expressão correlaciona-se com progressão e alto potencial metastático (SAITO et al. 2006). Estudos realizados pela nossa instituição, avaliando a expressão de tetraspaninas em carcinoma epidermoide de cavidade oral, demonstraram que a perda da expressão de CD9 correlaciona-se com aumento da incidência de metástases em linfonodos cervicais e prognóstico pior (BUIM et al. 2010). A perda de CD9 também está implicada em comportamento invasivo de tumores de mama, cólon, pulmão, entre outros (ZÖLLER 2009).

CD9 é uma proteína também conhecida por MRP-1 (*motility-related protein*), Tetraspanina 29 (Tspan-29), p24, Antígeno leucocitário MIC3, antígeno 5H9 e

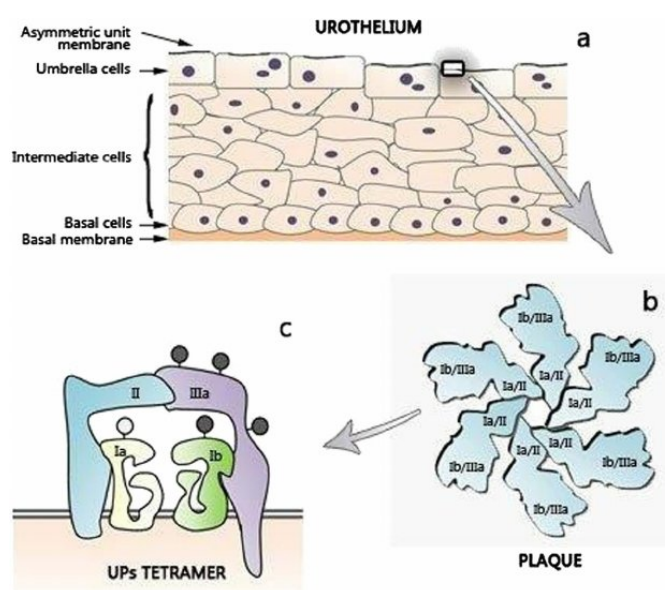
proteína inibidora de crescimento celular gene 2. Ela é composta por 228 aminoácidos, com 24kDa e está expressa em uma variedade de células hematopoiéticas e epiteliais. Associa-se com outras proteínas de superfície, como  $\alpha\beta4$  integrina (molécula CD49f/CD104) e HLA-DR, com importante papel na adesão, transdução de sinal e motilidade celular. Atualmente, outras funções são conhecidas como a agregação e ativação plaquetária, a fusão da célula ovo do espermatozóide, a regulação da formação da junção paranodal, além do papel no desenvolvimento de metástases tumorais, como já mencionado.

Em 2003, MHAWECH et al. avaliaram a expressão de CD9 em tumores uroteliais e reportaram que a perda de expressão correlacionou-se com progressão de doença superficial (pTa e pT1) para músculo-invasiva, porém não houve associação com número e tempo de recorrência. O valor prognóstico da perda do marcador foi um achado independente de grau e estadiamento, em uma coorte de 229 pacientes com doença não músculo-invasiva.

#### **1.4 AS UROPLAQUINAS**

As uroplaquinas são glicoproteínas transmembrana, que contêm um domínio testraspanina, encontradas nas células do urotélio. Suas sequências são altamente conservadas entre as espécies e encontradas em todos os organismos eucariotos multicelulares. Formam as placas assimétricas na membrana das células uroteliais terminalmente diferenciadas (unidade assimétrica de membrana - UAM), descritas a partir dos anos 1960s por trabalhos de microscopia eletrônica e cristalografia. Unidas, constituem uma barreira especializada e com plasticidade conformacional

para operar de acordo com as funções e adaptações mecânicas da mucosa uroexcretora. Dos quatro tipos descritos, as uroplaquinas UPIa e UPIb pertencem à família das tetraspaninas e, interagindo com UPII e UPIII, respectivamente, formam as UAM (Figura 4). Como a UAM é característica do urotélio, a expressão de uroplaquinas é tida como um marcador de diferenciação transicional em tecidos benignos ou neoplásicos (OLSBURGH et al. 2003).



Fonte: KĄTNIK-PRASTOWSKA et al. (2014)

**Figura 4** - Composição da placa de uroplaquina no urotélio. O urotélio é composto de três camadas: a basal, associada à membrana basal, a intermediária e a camada apical, contendo células em guarda-chuva (a). A superfície apical cria a unidade assimétrica de membrana (UAM) composta por placas hexagonais com seis tetrâmeros onde dois dímeros estão ligados (UPIa/UPII e UPIb/UPIII) (b); A UPIII é glicosilada (círculos em cinza) e não a UPII (c).

Em um estudo KAUFMANN et al. (2000) envolvendo 35 carcinomas uroteliais primários de bexiga e 32 metastáticos, a expressão de UPIII foi observada em 60% e 53% dos tumores, respectivamente. Os resultados mostram que alguns carcinomas uroteliais agressivos, mesmo pouco diferenciados, mantêm a expressão

de uroplaquina, preservando, assim, sua utilidade diagnóstica na pesquisa de sítio primário de neoplasias metastáticas.

## **1.5 JUSTIFICATIVA**

As tetraspaninas estão envolvidas com a diferenciação celular, de maneira que perdas na sua expressão poderiam relacionar-se ao processo oncogênico e, eventualmente, a neoplasias menos diferenciadas. Uma vez que os subtipos moleculares luminal e basal referem-se, respectivamente, a fenótipos celulares urotelial bem diferenciado e de reserva basal, é possível que a expressão das tetraspaninas acompanhe esse racional, o que traria possibilidade de integração no cenário clínico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a expressão protéica de uroplaquina III e CD9, correlacionando os achados com parâmetros clínicos, de diferenciação celular e subtipos moleculares.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Descrever a expressão protéica por imunohistoquímica de uroplaquina III e da tetraspanina CD9 em amostras tumorais de carcinoma de bexiga e amostras de urotélio benigno, na mesma população de pacientes;
- 2 Correlacionar os dados de expressão obtidos com os dados clínicos e anátomo-patológicos, em especial aqueles relacionados à diferenciação celular.
- 3 Correlacionar os dados de expressão proteica com os subtipos moleculares luminal e basal do carcinoma de bexiga.

### 3 DESENHO EXPERIMENTAL

#### 3.1 PACIENTES

##### 3.1.1 Elaboração da coorte de estudo

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente (Anexo 1). A partir dos registros do Biobanco, foram levantados casos consecutivos de carcinoma urotelial músculo-invasivos tratados por cistectomia no A.C.Camargo Cancer Center, entre 2000 e 2010. Lâminas e blocos de parafina correspondentes ao espécime cirúrgico foram recuperados do arquivo e revisados para confirmação de diagnóstico e estadiamento.

#### Quadro 3 - Critérios de inclusão e exclusão na coorte

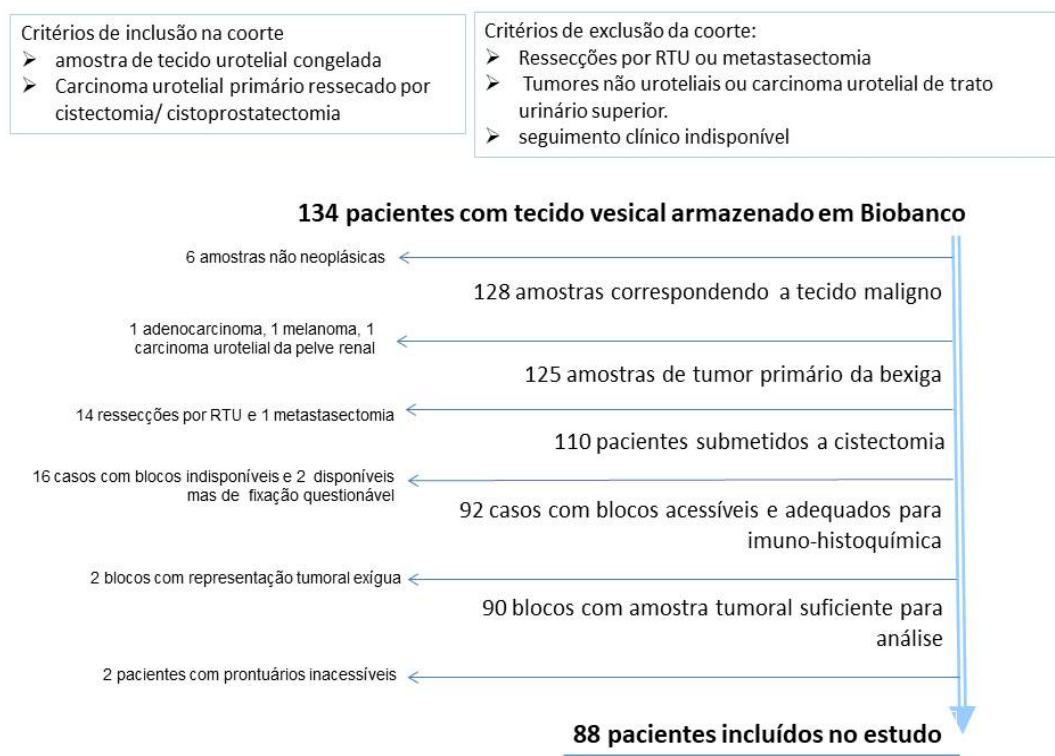
**Critérios de Inclusão:**

- possuir tecido tumoral congelado armazenado no Biobanco do Hospital A.C.Camargo;
- carcinoma urotelial primário da bexiga ressecado por cistectomia/ cistoprostatectomia;

**Citérios de Exclusão:**

- tumores não uroteliais, carcinoma urotelial metastático ou com sítio primário em trato urinário superior;
- ressecções por RTU (ressecção transuretral);
- indisponibilidade do bloco de parafina ou material insuficiente para análise.
- indisponibilidade de acesso às informações clínico-patológicas

Após o levantamento inicial de 134 pacientes, foram subtraídos 46 pacientes devido a armazenamento de tecido não-neoplásico (6), ressecções por RTU (15), tumores não uroteliais ou não primários (3), ausência de representatividade tumoral correspondente em blocos de parafina (2), indisponibilidade de blocos de parafina adequados para imuno-histoquímica ou construção de TMA (18) e indisponibilidade de acesso às informações clínico-patológicas (2).



**Figura 5** - Etapas de elaboração da coorte de estudo de 88 pacientes, considerando critérios de inclusão e exclusão, mostrando os números finais de amostras avaliadas por cada tipo de plataforma utilizada.

### 3.1.2 Processamento e anotação anatomopatológica

Todos os pacientes foram submetidos a cistectomia radical por carcinoma urotelial de bexiga com linfadenectomia pélvica (simples ou estendida), entre janeiro



de 2000 a outubro de 2010. As peças foram processadas macroscopicamente em sistema de *checklist* e laudadas de acordo com as edições correntes (5ª a 7ª) dos protocolos da *American Joint Comitee on Cancer- AJCC/ TNM* (EDGE et al. 2010). Os tumores foram dimensionados pelo maior eixo macroscópico. A configuração macroscópica foi anotada de acordo com o laudo anatomopatológico como papilífero e não-papilífero.

As lâminas foram revisadas por um uropatologista e as divergências entre o laudo inicial (primeiro patologista) e o patologista revisor foram trazidos a consenso com um terceiro patologista. Parâmetros histológicos como presença de variante histológica agressiva do carcinoma urotelial, diferenciação urotelial adversa (glandular ou escamosa), morfologia microscópica papilífera, morfologia microscópica não-papilífera e ulceração microscópica, foram consideradas quando correspondentes a pelo menos 10% do tumor amostrado. O estadiamento patológico (EDGE et al. 2010) foi categorizado em “não músculo-invasivo” (NMI) quando pTis, pTa ou pT1, “músculo-invasivo, confinado ao órgão” (MI-OC) quando pT2, e “músculo-invasivo, não confinado ao órgão” (MI-NOC) quando pT3 ou pT4.

### **3.1.3 Obtenção dos Dados Clínicos**

O banco de dados foi levantado por um urologista a partir dos prontuários médicos (SAME) e atualizadas a cada consulta de atendimento ambulatorial no Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica (última atualização em 20/04/2015). Este processo incluiu informações demográficas, antecedentes mórbidos, tipo de tratamento, terapias e diagnósticos prévios, achados dos exames endoscópicos, dados de recorrência e progressão da doença, complicações do

tratamento e situação clínica na data final do último seguimento de cada paciente (*follow-up*). Os parâmetros coletados seguem a padronização (“ficha”) elaborada pela equipe médica de Urologia do AC Camargo Cancer Center.

O seguimento dos pacientes baseou-se na data do último registro no prontuário eletrônico. Nos casos que excederam 12 meses sem atualizações, os pacientes/familiares foram contatados por telefone para verificação do *status* de sobrevida: vivo sem doença, vivo com doença, óbito relacionado ao carcinoma urotelial, óbito relacionado ao tratamento (toxicidade da adjuvância, complicações cirúrgicas imediatas ou tardias) e óbitos não relacionados (segunda malignidade primária, fratura benigna do fêmur e outros traumas, eventos isquêmicos e outras complicações). A sobrevida foi analisada como sobrevida doença específica (vivos vs. óbitos relacionados, considerando óbitos não relacionados e óbitos pelo tratamento como dados censurados).

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 Construção das lâminas histológicas de *tissue microarray* (TMA) em carcinomas invasivos e de recortes integrais em carcinomas não músculo-invasivos**

Foram selecionadas as áreas de tumor viável e de urotélio benigno a partir de lâminas coradas com H&E. A partir da correspondência com o bloco original, as áreas de tumor viável foram selecionadas e extraídas do bloco doador por um *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, USA) em cilindros de 1,0 mm de diâmetro, e então introduzidos em um bloco receptor. A partir deles, foram

preparados 100 cortes histológicos seriados em lâminas de vidro através de microtomia mecânica, na espessura de 4  $\mu\text{m}$ , previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics Inc, USA). Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por HE nos níveis 1, 25, 50, 75 e 100.

Os casos foram representados em quadruplicatas do tecido tumoral e duplicatas de tecido benigno correspondente (pareados), distribuídos em dois blocos de TMA (Figura 5). Estes blocos incluíram, além das amostras de interesse, tecidos variados malignos e benignos de outros órgãos, que: a) operaram como controles externos positivos e negativos para cada marcador incluído no estudo; e b) orientaram a condução dos *spots* durante a leitura das lâminas.

Ambos os TMAs foram submetidos às reações com CD9, GATA3, CK5/6 e CK14 e um deles foi submetido às reações com UPIII.



**Figura 6** - Scanner da lâmina histológica de TMA. Carcinomas músculo-invasivos ( $\geq pT2$ ) foram incluídos no TMA de 1,0 mm/*spot* em quadruplicata, acompanhados de duplicatas de urotélio periférico histologicamente benigno do mesmo paciente, cujos *spots* são vistos como “meia-luas”.

### 3.2.2 Imunoistoquímica

#### 3.2.2.1 Reações imunoistoquímicas

Os anticorpos foram adquiridos de fontes comerciais, tendo os clones sido selecionados a partir da biografia deste projeto. Os mesmos foram padronizados individualmente, de acordo com as melhores técnicas de diluição, recuperação antigênica e revelação (Quadro 3).

**Quadro 4** - Anticorpos primários (imunoistoquímica) utilizados para acessar a expressão proteica, com as respectivas referências e dados de padronização.

	Fonte	Clone	recuperação / diluição	incubação	revelação	sistema
CD9	Novocastra	NCL-CD9	1:50	32 min	Novocastra	automação
UP III	Novocastra	BC21	1:50	32 min	Novocastra	automação
GATA 3	Cell Marque	L50-823	PPU	32 min	Ultraview	automação
CK14	Ventana	SP53	PPU	32 min	Ultraview	automação
CK5/6	Ventana	D5/16B4	PPU	32 min	Ultraview	automação
<i>PPU: pronto para uso</i>						

As lâminas de foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 min, reidratadas em soluções decrescentes de etanol, e então lavadas em água. A recuperação antigênica foi obtida a partir de tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0, utilizando panela de pressão. Após a recuperação antigênica foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 min, seguido da aplicação de Protein Block (Dako Cytomation) por 20 min. As lâminas foram então incubadas de acordo com cada protocolo. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com o complexo secundário. A revelação utilizou o substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração, a hematoxilina.

Todas as reações foram feitas acompanhadas de um controle positivo, estabelecido previamente para cada anticorpo testado.

### 3.2.2.2 Quantificação da expressão proteica

A expressão de cada anticorpo foi quantificada em microscópio ótico, por um observador, de acordo com a metodologia descrita abaixo. O escore final foi a média obtida em cada representação (quaduplicata ou duplicata).

**Tetraspaninas:** Os marcadores CD9 e Uroplaquina III (UP III) foram avaliados quanto à porcentagem de células positivas (focal ou difuso quando >50%) em padrão citoplasmático e à intensidade da marcação (0-2). Os padrões luminal e membranosos foram anotados separadamente, sendo que casos com marcação exclusiva destes padrões foram considerados como score 0 e analisados de maneira individual.

**GATA3, CK5/6 e CK14:** Estes marcadores foram avaliados quanto à presença (1score >0) ou não (score 0) de expressão, e, quando presente, graduada a sua extensão em focal (1+) ou extensa (2+). Nas células positivas, GATA3 apresentou marcação nuclear uniforme e as citoqueratinas CK5 e CK14 marcação citoplasmática uniforme. O subtipo molecular foi inferido de acordo com publicação de consenso (DADHANIA et al. 2016) de acordo com a combinação da expressão destes marcadores, categorizados em positivo e negativo: Luminal GATA+/CK5-/CK14-, basal GATA3-/CK5+/CK14+, enquanto outras combinações foram consideradas de “subtipo não definido”.

Em TMAs, o score final correspondeu à média aritmética dos spots disponíveis para análise. Casos cujas perdas técnicas levaram a um spot único viável não foram desconsiderados.

### **3.2.3 Análise Estatística**

Os resultados foram analisados utilizando-se o software Stata 9.2 (Stata Corp, College Station, Tex). A igualdade de médias entre duas populações será avaliada através do teste Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas e da análise de variância 1-fator ANOVA (1-way ANOVA) para variáveis categóricas. A avaliação da correlação entre variáveis será desenvolvida através do coeficiente de correlação produto-momento (p de Pearson). A análise univariada em relação aos fatores prognósticos foi desenvolvida por modelo de regressão de Cox.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 COORTE**

#### **4.1.1 Caracterização Clínica da coorte**

A Tabela 1 resume os dados clínicos da coorte que se mostraram mais relevantes durante a análise dos resultados. A idade média (na data da cistectomia) foi de 66,9 anos (34-90). A média de comorbidades foi de 1,4 por paciente, sendo a hipertensão a mais prevalente (n=34/88; 39%). O tabagismo, importante fator de risco para o desenvolvimento das neoplasias uroteliais, foi observado em 62/86 (72%) pacientes com informação disponível, sendo 31 deles tabagistas ativos no momento da cirurgia e os demais ex-tabagistas, com tempo médio de cessação do hábito de fumar de 18 anos. O número de cigarros consumidos não esteve relacionado ao tempo de tabagismo ( $p=0,234$ ), sendo as médias desses parâmetros semelhantes entre fumantes (17.5 cigarros/dia durante 29.3 anos) e ex-fumantes (16.5 cigarros/dia, durante 26.9 anos).

**Tabela 1** - Distribuição categórica dos parâmetros clínicos e evolutivos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.

		N	%
Idade (anos)	30 a 59	20	23
	60 a 69	31	35
	70 a 79	27	31
	80 a 90	09	10
Sexo	Masculino	56	64
	Feminino	32	36
Uso de tabaco	Não fumante	24	28
	Ex-fumante	31	36
	Fumante	31	36
	Ignorado	2	.
Progressão p/ metástase	Sem progressão	47	59
	Com progressão	32	40
	Ignorado	08	.
Sobrevida doença específica	Vivos sem doença	25	29
	Vivos com doença	03	03
	Óbito por câncer	37	43
	Óbito por tratamento	12	14
	Óbito não relacionado à doença	09	10
	Perda de seguimento	02	.

O tempo de seguimento (percentil 75) foi de 8,15 anos na população viva e 2,21 anos nos pacientes que evoluíram com óbito, independentemente da causa. A taxa global de mortalidade foi 75,35% e a de mortalidade doença específica de 39,81%. O índice de progressão com metástases nodais e/ou à distância após cistectomia foi de 39,63%.

A Tabela 2 resume os dados relacionados ao diagnóstico e terapia prévios à cirurgia. Receberam tratamento prévio com onco-BCG (bacilo Calmette-Guérin) 17/88 (20%) pacientes da coorte. Destes, 5 apresentaram falha do tratamento (HERR e DALBAGNI 2003), todos acompanhados de progressão para doença músculo-



invasiva. Neoadjuvância com quimioterapia foi registrada em 8 casos. Vale notar que a seleção inicial de pacientes baseou-se no Banco de Tumores, portanto respostas completas não poderiam ter sido incluídas na coorte. A principal indicação para cistectomia foi a doença músculo-invasiva, já ao diagnóstico (n=55) ou fruto de progressão/falha de onco-BCG (n=13).

**Tabela 2** - Distribuição categórica dos parâmetros relacionados a diagnósticos e terapias prévias à cirurgia, na coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.

		N	%
Situação ao diagnóstico	Tumor não músculo-invasivo	33	37
	Tumor músculo-invasivo	55	63
Diagnóstico inicial	AC Camargo	50	57
	Outras instituições	38	43
Tratamento prévio à cirurgia	BCG [falha]	17 [5]	20 [29%]
	Neoadjuvância [respondedor]	09	10
	Progressão/ Falha de BCG	13	15
Indicação cirúrgica	Doença NMI extensa/ múltiplas recorrências	20	23
	Carcinoma músculo-invasivo	55	62

*BCG: terapia intravesical com Bacilo Calmette-Guerin; NMI: não músculo-invasiva;*

#### 4.1.2 Caracterização anatomopatológica da coorte

Foram recuperados do arquivo lâminas e blocos de parafina contendo material neoplásico dos pacientes incluídos na coorte (vide seção Materiais e Métodos). Todos os tumores eram carcinomas de alto grau. A revisão histológica classificou 14/88 (16%) tumores como variantes do carcinoma urotelial (7 micropapilíferos, 4 sarcomatóides 1 neuroendócrino 1 plasmocitóide e 1 contendo células tipo sinciciotrofoblasto). Ademais 23/88 (26%) tumores apresentavam diferenciação adversa (glandular ou escamosa).

A Tabela 3 resume os dados anatomopatológicos da coorte que se mostraram mais relevantes durante a análise dos resultados. Quarenta e três/88 (51%) tumores foram descritos como papilíferos à macroscopia e, destes, 26/41 (63%) foram também assim caracterizados histologicamente, permitindo considerar que uma parcela substancial dos carcinomas músculo-invasivos sejam carcinomas “superficiais” progredidos, ainda que o antecedente de tumor não músculo-invasivo tenha sido relatado em apenas 37% dos casos (Tabela 2). Em concordância com essa sugestão 18% das lesões eram multifocais e apenas 35% apresentaram carcinoma *in situ* na mucosa adjacente. As margens cirúrgicas foram asseguradas na grande maioria dos casos, sendo que dos 20% de cirurgias com margens coincidentes com neoplasia, metade correspondendo a comprometimento por carcinoma *in situ* em margens tubulares (ureteres ou uretra). Dois (02) casos não puderam ser estadiados uma vez que o material em parafina disponível para revisão estava incompleto e a análise atual diferia do relatado no laudo original. Quatro (04) produtos de cistectomia não tiveram o aspecto macroscópico adequadamente descrito pelo laudo original.

**Tabela 3** - Distribuição categórica dos parâmetros anatomopatológicos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.

<b>Categoria</b>	<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Estadiamento categorizado	NMI	12	14
	MI-OC	18	21
	MI-NOC	56	65
Estadiamento patológico (pT)	pTa	4	05
	pTis	1	01
	pT1	7	08
	pT2	18	21
	pT3	40	46
	pT4	16	19
Morfologia macroscópica	Papilífero	43	51
	Não papilífero	41	49
Ulceração	Não	33	39
	Sim	52	61
Histologia	Urotelial classic	51	58
	Diferenciação adversa	23	26
	Variante histológica	14	16
Morfologia microscópica	Papilífero	18	20
	Misto	21	24
	Não Papilífero	49	56
Multifocalidade	Não	72	82
	Sim	16	18
Carcinoma <i>in situ</i> na mucosa adjacente	Não	57	66
	Sim	31	35
Invasão vascular	Não	45	51
	Sim	43	49
Invasão perineural	Não	44	50
	Sim	44	50
Margem cirúrgica	Não	71	80
	Margem tubular (CIS)	8	10
	Margem adiposa (Invasivo)	9	10
Estadiamento nodal (pN)	pN0	55	63
	pN1	13	15
	pN2	10	11
	pN3	10	11

NMI: não músculo-invasivo; MI-OC: músculo-invasivo órgão confinado; MI-NOC: músculo-invasivo não órgão confinado; pT e pN: estadiamento patológico de extensão tumoral e nodal baseado na classificação TNM/ AJCC.

## 4.2 EXPRESSÃO PROTEICA

CD9: Foram analisadas 70 amostras de tecido urotelial neoplásico e 50 não neoplásico, com uma média de 2,7 spots por representação de malignidade e 1,1 spots por representação não neoplásica. A expressão foi predominantemente citoplasmática dos 12/70 casos com padrão membranoso, 8/12 apresentaram intensidade 2+. A expressão foi bastante uniforme entre os *spots*/áreas avaliados, sendo 60/70 amostras em relação à intensidade e 59/70 em relação à extensão. Os percentis 5, 10, 25, 50, 75 e 90 nas amostras neoplásicas foram, para intensidade: 0 - 0,125 - 1,0 - 1,0 - 2,0 - 2,0 e para extensão: 0 - 0 - 1,0 - 1,0 - 2,0 - 2,0, e nas amostras não neoplásicas foram, para intensidade: 1,0 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 2,0 - 2,0 e para extensão: 1,0 - 1,0 - 2,0 - 2,0 - 2,0.

Uroplaquina III (UP III): Foram analisadas 49 amostras de tecido urotelial neoplásico e 17 não neoplásico, com uma média de 2,75 spots por representação de malignidade e 1,2 spots por representação não neoplásica. O marcador, quando positivo, esteve uniformemente presente (extensão 2+) em todas as amostras. Nas amostras não neoplásicas, observou-se padrão luminal em 14/17 amostras (sendo 9/14 com intensidade 2+), sendo este padrão exclusivo em 5 amostras. Nas representações neoplásicas, o padrão luminal foi visto em combinação com o citoplasmático em apenas 5/49 amostras (com intensidade 1+) e luminal exclusivo em apenas 1 caso. Os percentis 5, 10, 25, 50, 75 e 90 nas amostras neoplásicas foram, para intensidade: 0 - 0 - 1,0 - 1,0 - 1,0 - 2,0 e para extensão: 0 - 0 - 2,0 - 2,0 - 2,0 - 2,0, e nas amostras não neoplásicas foram, para intensidade: 0 - 0 - 2,0 - 2,0 - 2,0 - 2,0 e para extensão: 0 - 0 - 2,0 - 2,0 - 2,0 - 2,0.

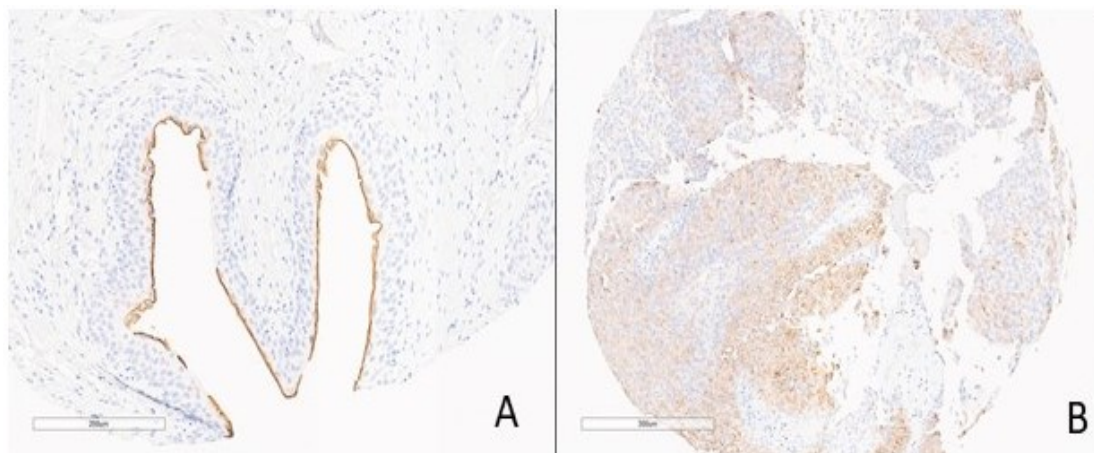
**Tabela 4** - Média [mediana] do score de expressão (0-2+) dos marcadores CD9 e UPIII em amostras neoplásicas (maligno) e não neoplásicas (benigno) de tecido urotelial

	CD9 maligno	CD9 benigno	UPIII maligno	UPIII benigno
intensidade	1,31 [1,0]	1,75 [2,0]	1,04 [1,0]	0,65 [1,0]
extensão	1,32 [1,0]	1,78 [2,0]	1,7 [2,0]	1,29 [2,0]

**Tabela 5** - Categorização n (%) do score (0-2+) de intensidade e extensão da expressão dos marcadores CD9 e UPIII em amostras neoplásicas (maligno) e não neoplásicas (benigno) de tecido urotelial

		CD9 maligno	CD9 benigno	UPIII maligno	UPIII benigno
	Intensidade				
negativo	0	07 (10)	00 (00)	07 <sup>†</sup> (14)	06* (35)
fraco	0,25 – 1,0	30 (43)	11 (22)	33 (67)	00 (00)
forte	1,25 – 2,0	33 (47)	39 (78)	09 (18)	11 (65)
	Extensão				
negativo	0	07 (10)	00 (00)	07 (15)	06 (35)
focal	1+	28 (40)	10 (20)	00 (00)	10 (59)
extenso	2+	35 (50)	40 (80)	42 (85)	01 (06)

<sup>†</sup> 1/7 padrão luminal exclusivo; \* 5/6 padrão luminal exclusivo



**Figura 7** - Imunohistoquímica de uroplaquina III. A-tecido não neoplásico com padrão luminal. B – tecido neoplásico com expressão citoplasmática difusa (>50%)

Como, nas amostras neoplásicas, a expressão de CD9 apresentou scores de intensidade muito semelhantes aos de extensão, e como a intensidade de expressão de UPIII promoveu uma melhor estratificação entre os casos, o parâmetro “intensidade” foi adotado para as análises relacionadas aos parâmetros clínicos e patológicos, a seguir.

#### 4.2.1 Relação da expressão de tetraspaninas com os parâmetros clínicos

Nas amostras malignas, o único parâmetro clínico significativamente associado à expressão proteica foi o sexo feminino e a perda completa da expressão de CD9. Dos 7 casos negativos para o marcador, 6/7 eram mulheres. A perda completa de CD9 ocorreu em 25% dos tumores femininos, enquanto em apenas 2% dos tumores masculinos. Nas amostras benignas, a alta expressão de CD9 esteve relacionada à ulceração do tumor, no mesmo paciente, tanto com relação à intensidade ( $p=0,012$ ) quanto extensão ( $p=0,055$ ). Enquanto apenas 3/11 (27%) dos tumores ulcerados tinham baixa intensidade de expressão de CD9 no urotélio

controle, 26/37 (70%) dos tumores ulcerados se desenvolveram em urotélios com alta expressão de CD9.

A expressão citoplasmática de UPIII não correlacionou-se com os parâmetros clínicos avaliados. Entretanto, a expressão luminal de UPIII em amostras malignas (7 casos), associou-se ( $p=0,042$ ) com o uso de tabaco, ocorrendo em 2/7 ex-fumantes e 3/7 fumantes (1/7 em não-fumante e 1/7 de status ignorado).

**Tabela 6** - Intensidade de expressão de CD9 e UPIII em amostras neoplásicas, em relação aos parâmetros clínicos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.

		CD9				UPIII			
		neg	fraco	forte	P	neg	fraco	forte	P
Idade	<60	02	07	08	0,887	01	06	04	0,248
	60-70	03	12	10		05	15	02	
	>70	02	11	15		01	12	03	
Sexo	Masculino	01	21	24	0,010	03	20	07	0,361
	Feminino	06	09	09		04	12	02	
Situação ao diagnóstico	NMI	01	10	12	0,527	03	11	04	0,776
	MI	06	20	21		04	22	05	
Uso de tabaco	Não fumante	03	07	08	0,595	02	12	01	0,688
	Ex-fumante	01	13	11		02	07*	02	
	Fumante	03	09	13		02	14*	05	
Progressão para metástase	Sem progressão	04	14	07	0,875	03	19	04	0,544
	Com progressão	03	13	02		04	11	04	
Sobrevida	Vivo	03	07	09	0,327	03	10	02	0,686
	Óbito por doença	04	16	12		03	13	05	
	Óbito por outras causas	00	06	11		04	19	06	

*BCG: terapia intravesical com Bacilo Calmette-Guerin; NMI: doença não músculo-invasiva; MI: doença músculo-invasiva \* 5/6 tumores com expressão luminal de UPIII ocorreram em fumantes (n=3) ou ex-fumantes (n=2)*

#### **4.2.2 Relação da expressão de tetraspaninas com os parâmetros patológicos**

Não houveram associações significativas entre a intensidade de expressão dos marcadores e os parâmetros patológicos inicialmente abordados. Entretanto, alguns aspectos são interessantes de serem observados.

Os casos com perda total de expressão predominaram em estádios avançados, sendo 7/7 casos negativos para CD9 estadiados como não-órgão confinados e, destes 6/7 apresentaram morfologia não-papilífera. Dos 08 casos multifocais, 6/8 eram fortemente positivos para CD9.

Cinco/7 casos negativos para UPIII se tratavam de carcinomas avançados pT3-pT4, porém, em contrapartida, foram assim também estadiados todos os 9 casos com intensidade forte para UPIII. Em todos os 07 casos com perda total da expressão do marcador não foi identificado carcinoma urotelial *in situ* na mucosa adjacente.



**Tabela 7** - Intensidade de expressão de CD9 e UPIII em amostras neoplásicas, em relação aos parâmetros anatomopatológicos da coorte de 88 pacientes tratados por cistectomia.

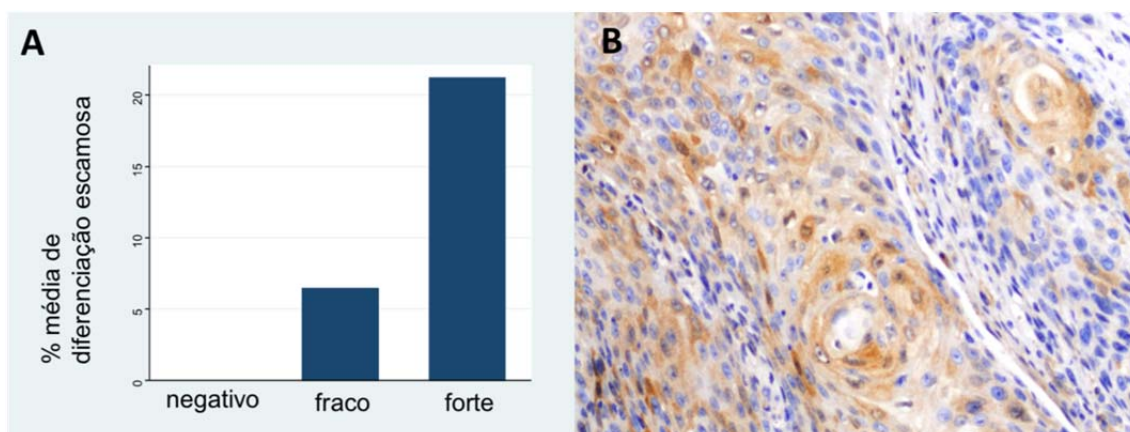
Categoria	Variáveis	CD9				UPIII			
		negativo	fraco	forte	P	negativo	fraco	forte	P (chi <sup>2</sup> )
Estadiamento categorizado	NMI	00	02	08	0,230	01	07	00	0,159
	MI-OC	00	08	07		01	08	00	
	MI-NOC	<b>07</b>	19	25		<b>05</b>	18	<b>09</b>	
Histologia	Urotelial clássico	03	17	13	0,201	03	19	03	0,159
	Diferenciação adversa	01	08	13		01	07	05	
	Variante histológica	03	03	07		03	06	01	
Morfologia microscópica	Papilífero	00	03	03	0,353	01	09	01	0,800
	Misto	01	04	11		02	07	03	
	Não Papilífero	<b>06</b>	21	19		04	16	05	
Multifocalidade	Não	06	28	06	0,176	05	27	07	0,816
	Sim	01	01	<b>06</b>		02	06	02	
Carcinoma <i>in situ</i> na mucosa adjacente	Não	05	19	20	0,898	<b>07</b>	19	07	0,072
	Sim	02	10	12		00	14	02	
Estadiamento nodal (pN)	pN0	04	19	15	0,343	05	24	05	0,607
	pN1, pN2,	03	11	17		02	09	04	
	pN3								

NMI: não músculo-invasivo; MI-OC: músculo-invasivo órgão confinado; MI-NOC: músculo-invasivo não órgão confinado; pT e pN: estadiamento patológico de extensão tumoral e nodal baseado na classificação TNM/ AJCC.

Apesar de não haver associação significativa com a parametrização da histologia agressiva inicialmente proposta, houve forte associação com o parâmetro de diferenciação escamosa isoladamente, com a alta intensidade de expressão de CD9 ( $p=0,006$ ). Não houve diferenciação escamosa em casos negativos para CD9, apesar de todos serem não órgão-confinados. A expressão de UPIII também foi maior em neoplasias com diferenciação escamosa ( $p=0,201$ ).

**Tabela 8** - Média da porcentagem de diferenciação escamosa em amostras neoplásicas, de acordo com a categorização da expressão de CD9 e UPIII

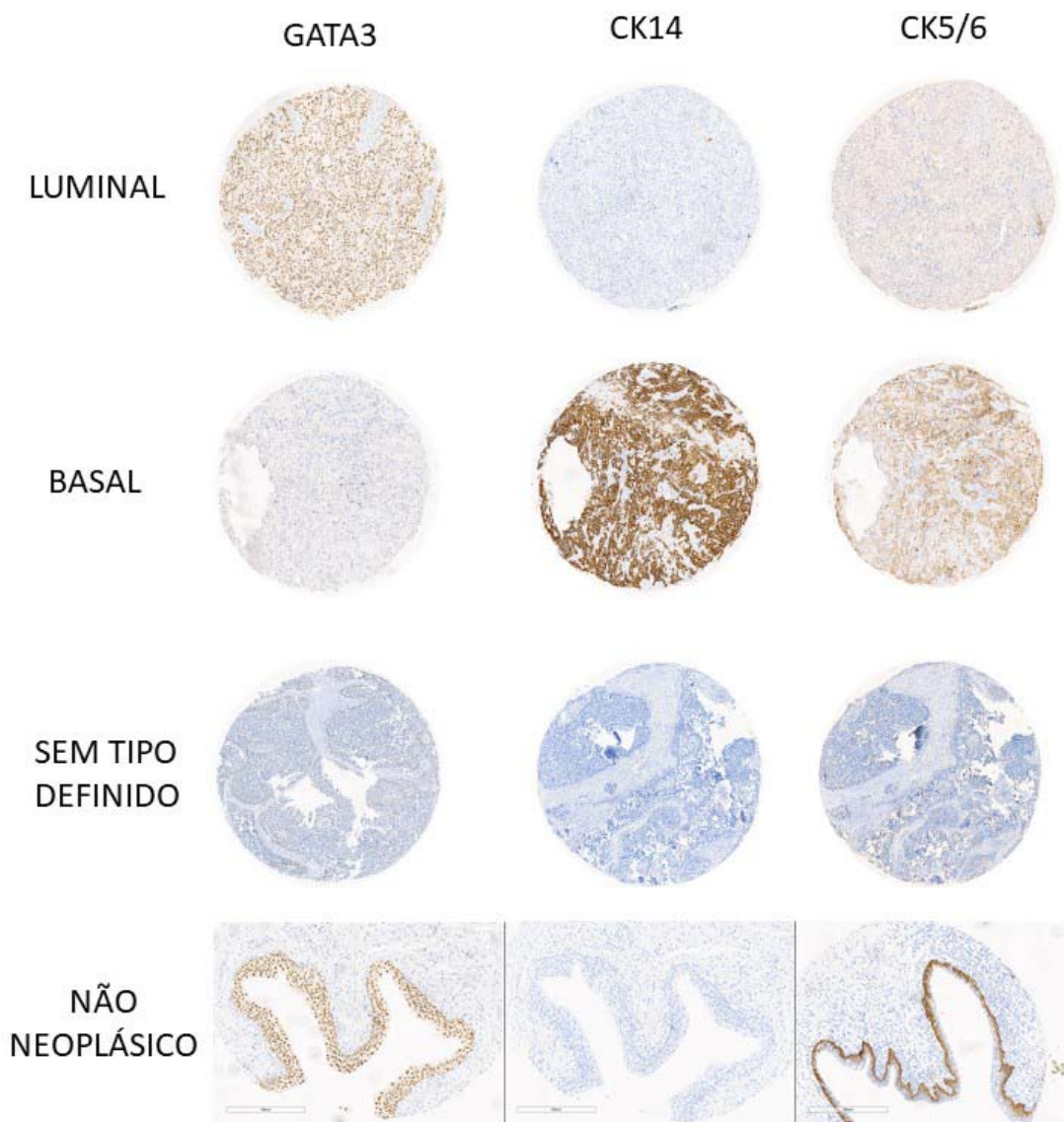
	Média da % de diferenciação escamosa	Desvio padrão	Frequência
CD9 negativo	0	0	07
CD9 fraco	06,4	14,5	28
CD9 forte	21,2	30,1	33
<b>Total CD9</b>	<b>12,9</b>	<b>24,2</b>	<b>68</b>
UP negativo	11,4	26,1	07
UP fraco	10,3	21,2	32
UP forte	27,8	37,0	09
<b>Total UP</b>	<b>13,75</b>	<b>25,75</b>	<b>48</b>



**Figura 8** - Expressão de CD9 em diferenciação escamosa. A) Box plot comparando os níveis de diferenciação escamosa, nas diferentes categorizações da expressão de CD9; B) expressão fraca e difusa de CD9 em uma neoplasia com diferenciação escamosa.

#### 4.2.3 Relação da expressão de tetraspaninas com os subtipos moleculares

A categorização dos tumores em Luminal e Basal pela imuno-histoquímica não correlacionou-se com nenhum dos parâmetros clínicos, patológicos ou de expressão de CD9 ou UPIII, na coorte.



**Figura 9** - Imunohistoquímica dos diferentes subtipos moleculares do carcinoma de bexiga e tecido não neoplásico

Dentre os marcadores estudados, além da correlação esperada entre as citoqueratinas (CK5/6 e CK14) e GATA3, houve também correlação positiva fraca entre UPIII e GATA3, da ordem de 0,38. Dos 7 casos negativos para UPIII, apenas 1/7 foi positivo para GATA3, enquanto houve concordância em 36/42 (86%) casos avaliáveis quanto à categorização em tumores positivos ou negativos para os marcadores.

**Tabela 9** - Correlação entre a intensidade da expressão dos marcadores CD9 e UPIII e o score de expressão dos marcadores relacionados ao subtipo molecular do carcinoma de bexiga, na coorte de 88 pacientes.

	<b>CD9</b>	<b>UPIII</b>	<b>GATA3</b>	<b>CK5/6</b>	<b>CK14</b>
<b>CD9</b>	1,000				
<b>UPIII</b>	-0,05	1,000			
<b>GATA3</b>	0,06	0,38	1,000		
<b>CK5/6</b>	0,07	-0,12	-0,45	1,000	
<b>CK14</b>	-0,01	0,03	-0,49	0,72	1,000

Apesar da ínfima correlação entre CD9 e GATA3 pela análise de Pearson dos scores contínuos, houve associação significativa entre esses marcadores ( $p=0,015$ ) quando categorizados em expressão negativa, fraca e forte. Dos 55 casos positivos para GATA3, apenas 3/55 (05%) foram negativos para CD9 e dos 63 tumores positivos para CD9, 11/63 (17%) foram negativos para GATA3.

**Tabela 10** - Distribuição categorizada da expressão de CD9 e GATA3.

	GATA3 negativo	GATA3 fraco	GATA3 forte	Total
CD9 negativo	4	2	1	7
CD9 fraco	4	4	22	30
CD9 forte	7	12	14	33
Total	15	18	37	70

Apesar das relações entre a expressão das tetraspaninas com GATA3, e com a presença de diferenciação escamosa e morfologia papilífera, não houve associação de CD9 ou UPIII com os subtipos moleculares do carcinoma de bexiga ( $p=0,1385$  e  $p=0,3261$ , respectivamente).

**Tabela 11** - Média dos scores de expressão (intensidade) de CD9 e UPIII de acordo com os subtipos moleculares do carcinoma de bexiga, caracterizados por imunohistoquímica.

	CD9			UPIII		
	Média do score	Desvio padrão	n	Média do score	Desvio padrão	n
<b>Sem tipo definido</b>	1,50	0,60	19	0,83	0,57	12
<b>Luminal</b>	1,26	0,62	35	1,26	0,56	19
<b>Basal</b>	1,18	0,84	16	1,00	0,63	11
Total	1,3	0,67	70	1,07	0,60	42

## 5 DISCUSSÃO

Nosso estudo mostrou que associações entre a expressão das tetraspaninas estudadas e parâmetros morfológicos relacionados aos subtipos moleculares do carcinoma urotelial, como morfologia papilífera e diferenciação escamosa. Estas associações não atingiram significância estatística, possivelmente devido ao tamanho da coorte e às perdas técnicas, porém a análise de distribuição categórica revelou aspectos interessantes sobre a relação destes marcadores e o processo de diferenciação celular.

Por exemplo, a perda completa de CD9 foi um evento pouco frequente ( $n=7$ ), porém exclusivo de carcinomas não-órgão confinados, dos quais  $6/7$  tumores eram não papilíferos e  $1/7$  misto. A perda completa de UPIII também foi mais frequente em neoplasias não-órgão confinadas ( $5/7$ ) e não papilíferas ou mistas ( $6/7$ ), contudo, notavelmente, a superexpressão de UPIII também ocorreu neste cenário ( $9/9$  não-órgão confinados e  $8/9$  não papilíferos ou mistos).

Há cerca de duas décadas, a perda de expressão de CD9 tem sido reportada como um fator prognóstico adverso em adenocarcinomas de cólon, pulmão, pâncreas, mama e carcinoma epidermoide esofágico, entre outros (MIYAKE et al. 1996; HIGASHIYAMA et al. 1997; HUANG et al. 1998; MORI et al. 1998; SHO et al. 1998). Mais recentemente, em uma publicação envolvendo a nossa instituição, a perda completa de CD9 em carcinomas epidermóides de orofaringe correlacionou-se com metástases linfonodais e menor sobrevida livre de doença (BUIM et al. 2010). Em carcinomas uroteliais, a expressão de CD9 foi abordada em um estudo isolado

por MHAWECH et al. (2003) que demonstrou associação da perda de expressão com tumores de maior grau e estadiamento. No subgrupo de tumores superficiais, os autores reportaram uma importante associação com progressão para carcinoma músculo-invasivo – mas não com recorrência - sendo que as neoplasias com perda completa de CD9 tiveram um risco relativo de 5.59 de progredir em comparação com tumores que preservavam a expressão do marcador.

Como mencionado anteriormente neste trabalho, CD9 é expresso em múltiplos tecidos sendo fundamental na adesão celular e motilidade. Considerando este papel, seria inicialmente intuitivo imaginar que o aumento da sua expressão estaria relacionado a um comportamento mais invasivo. Entretanto, as tetraspaninas também têm sido descritas como supressoras de metástase, inibindo a proliferação tumoral e regulando sinais de sobrevivência. Este papel reflete a sua capacidade de associação com múltiplas moléculas, recrutadas nos microdomínios específicos (ZÖLLER 2009). Além disso, a abundância de tetraspaninas nas microvesículas/exossomos derivados de tumores supõe uma função de comunicação intercelular, importante para a fisiologia de processos celulares e do microambiente.

Estes aspectos, de certa forma, também contribuem para explicar a forte expressão de CD9 demonstrada pelo nosso estudo nos tecidos uroteliais não neoplásicos associados aos carcinomas ulcerados. A expressão aumentada de tetraspaninas tem sido descrita em processos de cicatrização de mucosas, cujo papel inclui limitar a proliferação celular aos limites fisiológicos, controlando, por exemplo a avidéz por receptores de fatores de crescimento. Recentemente, SAIZ et al. (2017) demonstraram um aumento de CD9 nas células epiteliais da mucosa colônica de pacientes com doença inflamatória intestinal, mas não nas células inflamatórias.

Assim, a perda de CD9 implica na perda do controle do tráfego e biosíntese de proteínas citosólicas e transmembranas, como por exemplo as integrinas, que poderia produzir fenótipos agressivos relacionados à perda de coesão e migração celular. WOEGERBAUER et al. (2010) observaram que, em carcinomas de células de Merkel, a perda da expressão de CD9 era mais frequente nas metástases em trânsito e nodais em comparação com tumores cutâneos primários. Eles descreveram a presença de dois tipos de CD9 mRNA, diferindo apenas quanto ao comprimento de seus 5'UTRs, sendo que a estrutura mais longa seria característica de 5'UTRs inibidoras de tradução ribossomal. Análises quantitativas demonstraram que os clones metastáticos tinham não apenas uma redução global de CD9 mRNA, como também um *shift* proporcional a favor do tipo com 5'UTRs longas, sugerindo um papel importante na regulação pós-transcricional de CD9. Este tipo de regulação pós-transcricional relacionada à estrutura das 5'UTR foi descrita em vários genes *housekeeping* e proto-oncogenes, incluindo TP53 e MDM2 (VAN DER VELDEN e THOMAS 1999; CHEN et al. 2010), que são genes cujas mutações estão relacionadas à progressão de carcinomas uroteliais e ao subtipo basal (TCGA 2014). De fato, nosso estudo demonstrou que a média do escore de expressão de CD9 foi menor nos tumores basais (1,18), em relação aos tumores luminiais (1,26) e sem tipo definido (1,50).

Apesar de não termos encontrado associação entre a expressão das proteínas avaliadas e os subtipos moleculares, a relação entre a intensidade de CD9 e presença de diferenciação escamosa foi bastante significativa. Ademais, não houve diferenciação escamosa em casos com perda de CD9, apesar de todos serem não-órgão-confinados, Considerando seu papel na organização de actinas e controle da



proliferação celular, nossos achados sugerem que o recrutamento de CD9 é importante no processo de diferenciação escamosa, em carcinomas pouco diferenciados. Assim como a expressão constitutiva de CD9 no urotélio é necessária para a atividade metabólica normal, sua manutenção, ainda que parcial, em tumores poderia conferir capacidade de diferenciação divergente.

Embora os subtipos moleculares também se associem a parâmetros morfológicos, a diferença entre as médias de expressão das tetraspaninas nos subtipos luminal, basal e “não definido” não foram significativas na nossa coorte. Nosso resultado corrobora que os subtipos moleculares refletem uma miríade de alterações, em diferentes vias de sinalização que interagem de várias maneiras, muitas vezes de forma redundante. Desta forma, alterações em uma via ou mecanismo específico dificilmente é refletida neste tipo de subclassificação, o que explica em parte a dificuldade em estabelecer marcadores histológicos e imuno-histoquímicos que correspondam à complexidade genética de cada categoria.

Para atingir potencial invasivo e metastático, um clone neoplásico deve adquirir uma coleção de mutações que permitem múltiplas vantagens, designadas hallmarks por HANAHAN e WEINBERG (2000; 2014). Os autores admitem que a invasão é precedida pela aquisição de um fenótipo agressivo, resultante de uma mutação driver e instabilidade genômica, mas sua conclusão depende de habilidades relacionadas à interação com o microambiente. Estas incluem processos com participação direta ou indireta das tetraspaninas: perda de adesão celular e polaridade, motilidade celular, proteólise da membrana basal e matriz extracelular, transição epitélio-mesênquima e angiogênese. Dessa forma, acredita-se que a célula neoplásica e seu ambiente evoluam juntos para a progressão.

A expressão das tetraspaninas avaliadas também mostrou diferenças entre o urotélio não neoplásico e as amostras tumorais. Enquanto os carcinomas mostraram perda de intensidade e extensão de expressão de CD9 em relação às amostras não neoplásicas pareadas, houveram ganhos na expressão de UPIII. Esta aparente discrepância pode ser explicada pelo método de score aplicado à UPIII, que considerou positiva a expressão citoplasmática do marcador, enquanto o padrão luminal de expressão – frequente nas amostras não neoplásicas - foi anotado separadamente, porém considerado negativo. As amostras não neoplásicas mostraram expressão predominantemente forte e focal de UPIII (luminal exclusiva ou citoplasmática focal) e os tecidos tumorais mostraram expressão predominantemente fraca (citoplasmática) porém extensa, sendo que os carcinomas com perda completa não preservaram a expressão luminal. Dessa forma, pode-se dizer que a expressão anômala das tetraspaninas, consideradas como perda de CD9 e expressão subcelular de UPIII, foram características das amostras neoplásicas.

Outro achado inesperado foi a relação da perda de CD9 e o gênero, sendo que 6/7 tumores com perda completa ocorreram em mulheres. Embora nosso estudo não disponha de metodologias específicas para investigar este achado, alguns aspectos da literatura oferecem explicações alusivas. Este achado é ainda mais notável considerando o predomínio do carcinoma urotelial na população masculina, que contudo motiva questionamento a respeito de possíveis diferenças biológicas hormônio-dependentes. Alguns estudos epidemiológicos, como o de THORSTENSON et al. (2016), envolvendo 30.310 pacientes sugerem que o carcinoma urotelial em mulheres suecas tem um curso mais agressivo. Contudo, o mesmo estudo mostra que uma maior proporção de homens receberam tratamento

otimizado (com BCG ou cistectomia radical). Há ainda, extensa literatura a respeito do papel de receptores hormonais no desenvolvimento e progressão do carcinoma urotelial. A hiper-expressão de receptor de estrógeno é mais frequente em tumores músculo-invasivos, porém sem diferença significativa entre os gêneros (IDE et al. 2017). Também foi demonstrado que a manutenção de GATA3 previne a progressão tumoral em modelos experimentais de câncer de bexiga e é inversamente regulada por hormônios sexuais (LI et al. 2014). De fato, no nosso estudo, dos 7 casos com perda de CD9, 6/7 apresentaram expressão negativa ou fraca de GATA3. Considerando que as tetraspaninas promovem a regulação intercelular a partir de microvesículas contendo receptores de membrana, é possível que sua perda funcional esteja relacionada com estes aspectos.

No nosso estudo, interpretamos a expressão citoplasmática de UPIII em carcinomas uroteliais como anômala e possivelmente relacionada à perda da diferenciação celular durante o processo oncogênico. TRATNJEK et al. (2017) demonstraram, em modelos experimentais, a relação entre a diferenciação urotelial e a localização dos filamentos e microtúbulos das placas formadas por uroplaquinas. As células uroteliais normais ainda em processo de diferenciação mantinham os filamentos no citoplasma subapical e os microtúbulos em padrão *net-like*. Nas células terminalmente diferenciadas, os filamentos desapareciam do compartimento citoplasmático e os microtúbulos permaneciam como uma fina camada justaposta à membrana plasmática. A inibição experimental da formação de filamentos actínicos e microtúbulos foi capaz de reduzir, respectivamente, a endocitose e o transporte de vesículas.

## 6 CONCLUSÕES

- 1 As amostras malignas mostraram perda de intensidade e extensão da expressão de CD9 e padrão citoplasmático (anômalo) de UPIII. Estas alterações podem ser interpretadas acerca da perda de diferenciação celular durante o processo oncogênico.
- 2 A perda de CD9 foi exclusiva em carcinomas não-órgão confinados, a maioria não papilíferos. A associação entre a perda de CD9 e comportamento agressivo foi demonstrada em vários órgãos e provavelmente relaciona-se com o seu papel supressor de metástase, associado ao controle da proliferação celular e sinais de sobrevivência.
- 3 A diferenciação escamosa relacionou-se de maneira crescente com a intensidade de expressão de CD9 e foi inexistente em casos com perda completa. Este achado sugere que o recrutamento de CD9 também é importante para conferir à célula capacidade de diferenciação divergente.
- 4 A expressão das tetraspaninas estudadas mostrou diferenças em relação a alguns parâmetros morfológicos de diferenciação celular, comuns à classificação em subtipos moleculares, porém não houve associação direta. Este achado corrobora que os subtipos refletem uma miríade de alterações, dificilmente reproduzidas por alterações em uma via ou mecanismo específico.
- 5 O melhor entendimento da dinâmica das tetraspaninas em tecidos uroteliais neoplásicos e não neoplásicos e sua contribuição no processo de

diferenciação tecidual poderá propiciar o desenvolvimento de estratégias para controlar terapeuticamente o seu papel na progressão do carcinoma, eventualmente em paralelo às estratégias relacionadas aos subtipos moleculares.

## 7 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. **Cell Mol Life Sci** 2001; 58:1189-205.

Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the skin: a study of 256 cases. **Ann Surg** 1921; 73:141-60.

Buim ME, Lourenço SV, Carvalho KC, et al. Downregulation of CD9 protein expression is associated with aggressive behavior of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2010; 46:166-71.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. **Nature** 2014; 507:315-22.

Chen J, Xie F, Zhang L, Jiang WG. iASPP is over-expressed in human non-small cell lung cancer and regulates the proliferation of lung cancer cells through ap53 associated pathway. **BMC Cancer** 2010; 30:10:694.

Choi W, Porten S, Kim S, et al. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. **Cancer Cell** 2014; 25:152-65.

Cordon-Cardo C. Molecular alterations associated with bladder cancer initiation and progression. **Scand J Urol Nephrol Suppl** 2008; (218):154-65.

Dadhania V, Zhang M, Zhang L, et al Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. **EBioMedicine** 2016; 12:105-17.

Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:1471-4.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC Cancer staging manual**. 7<sup>th</sup> ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Urinary bladder; p.497-502.

Garcia del Muro X, Condom E, Vigués F, et al. p53 and p21 Expression levels predict organ preservation and survival in invasive bladder carcinoma treated with a combined-modality approach. **Cancer** 2004; 100:1859-67.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2014; 144:646-74.

Herr HW, Dalbagni G. Defining bacillus Calmette-Guerin refractory superficial bladder tumors. **J Urol** 2003; 169:1706-8.

Higashiyama M, Doi O, Kodama K, et al. Immunohistochemically detected expression of motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) in lung adenocarcinoma and its relation to prognosis. **Int J Cancer** 1997; 74:205-11.

Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. **Am J Pathol** 1998; 153:973-83.

Ide H, Inoue S, Miyamoto H. Histopathological and prognostic significance of the expression of sex hormone receptors in bladder cancer: a meta-analysis of immunohistochemical studies. **PLoS One** 2017; 12:e0174746.

Kątnik-Prastowska I, Lis J, Matejuk A. Glycosylation of uroplakins. Implications for bladder physiopathology. **Glycoconj J** 2014; 31:623-364.

Kaufmann O, Volmerig J, Dietel M. Uroplakin III is a highly specific and moderately sensitive immunohistochemical marker for primary and metastatic urothelial carcinomas. **Am J Clin Pathol** 2000; 113:683-7.

Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, et al. Bladder cancer molecular taxonomy: summary from a Consensus Meeting. **Bladder Cancer** 2016; 2:37-47.

Li Y, Ishiguro H, Kawahara T, Miyamoto Y, Izumi K, Miyamoto H. GATA3 in the urinary bladder: suppression of neoplastic transformation and down-regulation by androgens. **Am J Cancer Res** 2014; 4:461-73.

Maluf FC, Cordon-Cardo C, Verbel DA, et al. Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. **Ann Oncol** 2006; 17:1677-86.

Martin FM, Kamat AM. Definition and management of patients with bladder cancer who fail BCG therapy. **Expert Rev Anticancer Ther** 2009; 9:815-20.

McConkey DJ, Choi W, Dinney CP. Genetic subtypes of invasive bladder cancer. **Curr Opin Urol** 2015; 25:449-58.

Mhaweck P, Herrmann F, Coassin M, Guillou L, Iselin CE. Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression. **Cancer** 2003; 98:1649-57.



Miyake M, Nakano K, Itoi SI, Koh T, Taki T. Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. **Cancer Res** 1996; 56:1244-9.

Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VR. **WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs**. 4<sup>th</sup> ed. New York: World Health Organization; 2016.

Morgan TM, Keegan KA, Clark PE. Bladder cancer. **Curr Opin Oncol** 2011; 23:275-82.

Mori M, Mimori K, Shiraishi T, et al. Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression in colon cancer. **Clin Cancer Res** 1998; 4:1507-10.

Olsburgh J, Harnden P, Weeks R, et al. Uroplakin gene expression in normal human tissues and locally advanced bladder cancer. **J Pathol** 2003; 199:41-9.

Reuter VE. The pathology of bladder cancer. **Urology** 2006; 67(3 Suppl 1):11-7; discussion 17-8.

Rodriguez Pena MDC, Tregnago AC, Eich ML, et al. Spectrum of genetic mutations in de novo PUNLMP of the urinary bladder. **Virchows Arch** 2017; 471:761-7.

Saito Y, Tachibana I, Takeda Y, Yamane H, et al. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. **Cancer Res** 2006; 66:9557-65.

Saiz ML, Cibrian D, Ramírez-Huesca M, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, Sánchez-Madrid F. Tetraspanin CD9 limits mucosal healing in experimental colitis. **Front Immunol** 2017; 8:1854.

Schultz L, Spagnul SJT, Damm GR, et al. Ulceration in bladder cancer associates with extravesical disease, independent of cell cycle, or hypoxia pathways status: Integrating gross morphology and expression profiles in cystectomies. **Urol Oncol** 2016; 34:484.e9-484.e17.

Sho M, Adachi M, Taki T, et al. Transmembrane 4 superfamily as a prognostic factor in pancreatic cancer. **Int J Cancer** 1998; 79:509-16.

Stein JP, Lieskovsky G, Cote R, et al. Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. **J Clin Oncol** 2001; 19:666-75.

Termini CM, Gillette JM. Tetraspanins function as regulators of cellular signaling. **Front Cell Dev Biol** 2017; 5:34.

Thorstenson A, Hagberg O, Ljungberg B, et al. Gender-related differences in urothelial carcinoma of the bladder: a population-based study from the Swedish National Registry of Urinary Bladder Cancer. **Scand J Urol** 2016; 50:292-7.

Tratnjek L, Romih R, Kreft ME. Differentiation-dependent rearrangements of actin filaments and microtubules hinder apical endocytosis in urothelial cells. **Histochem Cell Biol** 2017; 148:143-56.

Tzai TS, Tsai YS, Chow NH. The prevalence and clinicopathologic correlate of p16INK4a, retinoblastoma and p53 immunoreactivity in locally advanced urinary bladder cancer. **Urol Oncol** 2004; 22:112-8.

van der Velden AW, Thomas AA. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. **Int J Biochem Cell Biol** 1999; 31:87-106.

Woegerbauer M, Thurnher D, Houben R, et al. Expression of the tetraspanins CD9, CD37, CD63, and CD151 in Merkel cell carcinoma: strong evidence for a posttranscriptional fine-tuning of CD9 gene expression. **Mod Pathol** 2010; 23:751-62.

Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:40-55.

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



São Paulo, 29 de março de 2019.


Ao  
Dr. Fernando Augusto Soares  
Aluna: Gilcy Raymundo Damm (Doutorado)

**Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1558/11B**  
**"IMUNOEXPRESSÃO DAS TETRASPANINAS (CD9 E UPIII) NO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA."**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 26/03/2019, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 26/02/2019, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático: "*Perfil de expressão proteica, gênica e de miRNAs no carcinoma urotelial de bexiga*", registrado neste CEP sob n°. 1558/11. O projeto afiliado em referência será Doutorado da aluna: Gilcy Raymundo Damm, sob orientação do Dr. Fernando Augusto Soares.

Atenciosamente,



**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1



## Original article

# Ulceration in bladder cancer associates with extravesical disease, independent of cell cycle, or hypoxia pathways status

## Integrating gross morphology and expression profiles in cystectomies

Luciana Schultz, M.D., Ph.D.<sup>a</sup>, Samuel J.T. Spagnul, M.D.<sup>a</sup>, Giley R. Damm, B.Sc.<sup>a</sup>,  
Isabela W. da Cunha, M.D., Ph.D.<sup>a,b</sup>, Stephania M. Bezerra, M.D., M.Sc.<sup>b</sup>,  
Walter H. da Costa, M.D., Ph.D.<sup>a,c,\*</sup>, Gustavo C. Guimaraes, M.D., Ph.D.<sup>a,c</sup>,  
Stenio deC Zequi, M.D., Ph.D.<sup>a,c</sup>, Fernando A. Soares, M.D., Ph.D.<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Antonio Prudente Foundation, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pathology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Urology Division, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Received 1 March 2016; received in revised form 16 May 2016; accepted 30 May 2016

### Abstract

**Objective:** Ulceration is common in bladder tumors, but its prognostic role, although intuitive, is not established. We aim to explore the presence of gross ulceration and its relationship with other morphological and biological features classically associated with extravesical disease, in patients submitted to radical cystectomy.

**Methods:** Tumor size and morphology were noted on 101 cystectomy patients (2000–2010). Papillary, exophytic, and vegetant tumors were grouped as “papillary” and solid/nodular, ulcerated and infiltrative as “nonpapillary.” Ulceration was noted grossly in every case as a binary parameter, regardless of morphology. Immunohistochemistry was performed for hypoxia (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor), and cell cycle proteins (pRb, p53, and cyclin D1).

**Results:** Mean age was 66.7 year, male:female ratio was 2:1, 20 patients received bacillus Calmette-Guerin and 10 neoadjuvant chemotherapy. Upstaging rate was 56.4%. Ulcerated lesions presented mostly as nonpapillary and nonorgan confined (nOC), whereas nonulcerated tumors were often papillary and organ confined (OC). Tumor size was smaller in nonpapillary tumors ( $P = 0.002$ ), but did not associate with altered hypoxia or cell cycle expressions. pRb and cyclin D1 loss and p53 overexpression were more frequent in ulcerated and non-OC tumors as did the phenotype vascular endothelial growth factor-negative/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -low ( $P < 0.001$ ). On a multivariate model, ulceration was an independent predictor of non-OC and extravesical disease.

**Conclusion:** Patients with ulcerated tumors were often staged with extravesical disease, independent of other morphologic and biological features known to affect prognosis. Prospective studies are needed to confirm the predictive value of tumor ulceration at cystoscopy, which could improve patient stratification for neoadjuvant chemotherapy.

**Graphical abstract:** Interactions between clinical and biological parameters of known prognostic relevance in bladder cancer, and its relationship with tumor ulceration. © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Bladder cancer; Ulceration; Morphology; Hypoxia; Cell cycle; papillary

This work was financially supported by FAPESP (grant 2011/18476-6) (São Paulo State Research Support Foundation), Brazil.

\* Corresponding author. Walter Henrique da Costa, M.D., Ph.D., Urology Division, A.C. Camargo Cancer Center, Rua Professor Antônio Prudente, 211, Sao Paulo, Brazil. Tel.: +55-113-021-4155.

E-mail address: waltercosta@hotmail.com (W.H. da Costa).

### 1. Introduction

Radical cystectomy is indicated in patients with muscle-invasive bladder cancer (MIBC) and treatment-refractory non-MIBC (NMIBC). Outcome after surgery differs significantly between organ confined (OC) and extravesical

### Anexo 3 - Abstracts apresentados em Congressos Internacionais (USCAP 2013 e USCAP 2015)

SCHULTZ, L., SPAGNUL, S.J.T., BEZERRA, S.M., DAMM, G.R., GIULIANGELIS, T.S., COSTA, W.H., GUIMARAES, G.C., SOARES, F.A., CUNHA, I.W. p53, pRb, Cyclin D1 and HER2 Expression in a Heterogeneous Cystectomy Cohort In: USCAP Annual Meeting 2013, Baltimore, Maryland. The 102nd Annual Meeting Abstracts 2013. V26. P.

[1033] p53, pRb, Cyclin D1 and HER2 Expression in a Heterogeneous Cystectomy Cohort

*Luciana Schultz, Samuel JT Spagnul, Stephania M Bezerra, Gilcy R Damm, Thais S Giuliangelis, Walter H da Costa, Gustavo C Guimaraes, Fernando A Soares, Isabela W da Cunha. Antonio Prudente Foundation, São Paulo, Brazil; AC Camargo Hospital, São Paulo, Brazil*

**Background:** Invasive urothelial carcinoma still carries a high mortality rate. Hence, reproducible and clinically useful prognostic markers are needed for better patient stratification. p53, pRb, cyclin D1 and HER2 are implicated in progression and invasive behavior in urothelial carcinoma. We investigated immunohistochemical expression of these markers and correlated with pathological stage and outcome. **Design:** Slides and paraffin blocks were retrieved from 98 patients with urothelial carcinoma treated by cystectomy at our institution (2000-2010). Immunohistochemistry was performed for each marker on TMA and whole slides. Pathological stage (pT) was categorized as Superficial (pTis/pTa/pT1; n=18), Muscle-invasive (pT2; n=22) and non-Organ Confined (non-OC) (pT3/pT4; n=58). For each marker cut-offs for altered expression were defined based on comparison to corresponding benign urothelial controls. Outcome data was available in 88 patients as disease specific survival (DSS), overall survival (OS) and progression. **Results:** Mean patient age was 66y (34-90) and M:F ratio was 1.85. Pre-operative BCG treatment was rendered in 16/78 (20%) patients. Altered expression of p53, pRb, cyclin D1 and HER2 was seen in 39 (39%) 21 (21%), 39 (39%) and 18 (18%) tumor samples, respectively. Markers within the same pathway significantly correlated: pRb with cyclin D1 and p53 which in turn correlated with HER2 (rr 0.2-0.3; p<0.03). Pathological stage was predictive of all outcome parameters. Abnormal expression of pRb and cyclin D1 associated with non-OC disease (p=0.05 and p=0.0001, respectively). Co-alteration of p53 and pRb was present in 14 tumors 12 of which were non-OC (p=0.02). OS, DSS and progression rate were 46%, 67% and 37%, respectively (mean FU of 52,2mo). pRb loss was a predictor of OS in superficial tumors (p=0.02) while p53 showed a trend towards progression (p=0.08) but no marker was predictive of DSS. **Conclusions:** All markers were altered in urothelial carcinoma compared to benign controls. Proteins within the same pathway were well correlated. Although high cyclin D1 expression and pRb loss were significantly more frequent in non-OC disease, prognostic value was limited in our cohort. Category: Genitourinary (including renal tumors)

**Tuesday, March 5 2013 9:30 AMPoster Session III # 100, Tuesday Morning**

**SCHULTZ, L., DAMM, G.R., COSTA, W.H., GUIMARAES, G.C., CUNHA, I.W., SOARES, F.A. Gross Morphology Correlates with Non-Organ Confined Disease (Non-OC) in Cystectomy Specimens In: USCAP Annual Meeting 2013, Baltimore, Maryland. The 102nd Annual Meeting Abstracts 2013. V26. P.**

**[1034] Gross Morphology Correlates with Non-Organ Confined Disease (Non-OC) in Cystectomy Specimens**

*Luciana Schultz, Gilcy R Damm, Walter H da Costa, Gustavo C Guimaraes, Isabela W da Cunha, Fernando A Soares. Fundação Antonio Prudente, Sao Paulo, Brazil; AC Camargo Hospital, São Paulo, Brazil*

**Background:** Gross and microscopic features correlate with pathological staging in cystectomy specimens. Current recommendations suggest that size and location are relevant but do not contemplate presence of ulceration or gross morphology of the lesion. **Design:** We reviewed slides from 100 patients with urothelial carcinoma treated by cystectomy at our institution (2000-2010). Adequate gross info was available on 98 reports. Gross morphology description was categorized in 4 groups: I. Papillary (n=2); II. Exophytic (n=18); III. Vegetant, Sessile or Nodular (n=32); IV: Infiltrative, Ulcerative or Flat ulcerated (n=46). Presence of ulceration was assessed independent of Gross category. Pathological stage (pT) was grouped in Superficial (pTis/pTa/pT1; n=20), Muscle-invasive (pT2; n=24) and non-OC (pT3/pT4; n=56). Dome, anterior wall and bladder neck were considered adverse locations. Tumor volume was obtained in 80 reports multiplying the 3 largest dimensions. Microscopic features such as arterial and perineural invasion, node density and positive margins were also accessed. **Results:** Mean patient age, tumor size and volume was 66 (34-90), 3.8 cm (0.8-8.5) and 35 cm<sup>3</sup> (0.4 – 194), respectively and M:F ratio was 1.85. Gross morphology and presence of ulceration significantly correlated with pT (p=0.003 and p=0.001, respectively). All tumors from adverse locations were at least muscle invasive (p=0.09). Tumors from Gross category IV were smaller (p=0.003 for cm and 0.007 for cm<sup>3</sup>), despite association with non-OC disease. Gross category IV and presence of ulceration did not correlate with microscopic parameters but all microscopic parameters correlated with non-OC disease and among each other (p<0.03). On a multivariate analysis for non-OC disease, Gross category IV was an independent predictor of non-OC disease (p=0.009), along with arterial and perineural invasion. Node density and positive margins did not keep the significance. **Conclusions:** Ulceration and tumor gross morphology are strongly associated with non-OC bladder cancer. Therefore including this data in the cystectomy report may optimize prognostic information, along with other classic gross and microscopic parameters. Category: Genitourinary (including renal tumors)

**Monday, March 4 2013 9:30 AM Poster Session I Stowell-Orbison/Surgical Pathology/Autopsy Awards  
Poster Session # 156, Monday Morning**

SCHULTZ, L., COUTINHO-CAMILLO, C.M., CASTRO, I., DAMM, G.R., SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., ONUCHIC, L.F., SOARES, F.A. Dendrogram Analyses of Relative Expression Between Bladder Cancers and Controls Identify PTEN-HIF Association as an Alteration Characteristic of Malignancy In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.

[1028] Dendrogram Analyses of Relative Expression Between Bladder Cancers and Controls Identify PTEN-HIF1 $\alpha$  Association as an Alteration Characteristic of Malignancy.

*Luciana Schultz, Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Samuel JT Spagnul, MD, Isabela W Cunha M.D. Ph.D, Luiz F Onuchic, MD, PhD, Fernando Soares MD, PhD. AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil and Universidade de São Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil.*

**Background:** Drugs that target the PIK3/AKT/mTOR pathway are been considered for advanced or post-cisplatin bladder cancer. Clinical trials have shown long term response in some patients but resistance is not infrequent and relates to PTEN loss. Here we compare and measure intrinsic associations between mTOR pathway members and their main known interactions, in malignant and nonmalignant urothelial tissue. **Design:** Samples from 101 bladder tumors resected by cystectomy and adjacent histologically benign urothelium (paired control) were collected. Markers (proteins/genes) of cell cycle, mTOR and hypoxia-inducible pathway were analyzed by immunohistochemistry (IHC) and RTPCR. Relative expression of tumors and controls was obtained by subtraction (IHC) or division (RTPCR). Dendrograms were constructed to compare and measure intrinsic associations. A discriminatory multivariate analysis was used to separate variables (Wilks Lambda test) and measure centroid distances (Mahalanobis test). Cluster analysis was then used to determine the associations and categorize groups. The markers were organized by median connection within groups as elements of a tree, where the leaves represent patients and the length between knots represent distance by Pearson correlation. An  $\alpha \leq 5\%$  was adopted for type I error and  $\beta \leq 20\%$  for type II. **Results:** The dendrogram of immunoexpression in controls followed a physiological array, discriminating the different pathways and linking hypoxia with cell cycle proteins before connection with the mTOR branch. In tumors, dendrograms of relative expression showed significant association between PTEN and HIF1 $\alpha$ , both at the protein and gene expression levels. The imbalance included association between pRB and the pS6/pAKT duet displayed by IHC. The finding of association between caspase3 and AKT3 mRNA expression was also suggestive of pathway deregulation. Analysis of absolute expression in tumor samples did not reveal association between PTEN and HIF1 $\alpha$ . **Conclusion:** mTOR and hypoxia pathways are deregulated in bladder tumors and a PTEN-HIF1 $\alpha$  association may play a pivotal role. Analyzing the relative expression between tumors samples and adjacent histologically benign urothelium seems more robust than tumor expression alone. Our results are in line with targeted therapy for mTOR and hypoxia pathways in bladder cancer and further suggest that combined inhibition might be beneficial.

**Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 119, Tuesday Morning**



COUTINHO-CAMILLO, C.M., SCHULTZ, L., CASTRO, I., DAMM, G.R., SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., ONUCHIC, L.F., SOARES, F.A. Dendrogram Analyses of Relative Expression Between Bladder Cancers and Controls Identify PTEN-HIF Association as an Alteration Characteristic of Malignancy In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.

**[849] Low Immunoexpression of phosAKT Correlates with Upregulation of mTOR Pathway and HIF1 $\alpha$  Gene Expression**

*Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Luciana Schultz, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Isabela W Cunha M.D. Ph.D, Luiz F Onuchic, MD, PhD, Fernando Soares MD, PhD. AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil and Universidade de São Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil.*

**Background:** Drugs that target the PIK3/AKT/mTOR pathway are been considered for advanced or post-cisplatin bladder cancer. Clinical trials have shown long term response in some patients but resistance is not infrequent and is may relate to pathway interactions or deregulation. Accessible biomarkers of tumor response are needed for better patient selection. **Design:** Samples from 72 bladder tumors resected by cystectomy and adjacent histologically-benign urothelium (paired control) were collected. Immunohistochemistry (IHC) for phosAKT (Ser473) was performed and scored as percent of positive cells. Cluster analysis identified 2 groups and a cut-off of 3.3 was reached by ROC curve. Gene expression of mTOR pathway members (PTEN, AKT3, MTOR, EIF4EBP1 and RPS6), HIF1 $\alpha$  and cell cycle (TP53, RB1 and MIK67) were analyzed by RT-PCR. Categorized phosAKT expression was then compared to mRNA levels by Kruskal-Wallis test with Muller-Dunn post-test. **Results:** Mean (median) phosAKT expression was 18.8 (10.0) in malignant samples and 61.8 (70.0) in controls. Tumors in the cluster with lower levels of phosAKT (n=7) significantly associated with higher mRNA expression of all genes related with mTOR pathway and HIF1 $\alpha$  (p<0.001), but not with those related to cell cycle (p=NS). Mean mRNA expression in this subset compared to the remaining samples were 3.45 vs. 0.44 for PTEN 2.87 vs. 0.08 for AKT3 19.53 vs. 0.09 for MTOR 15.70 vs. 0.18 for EIF4EBP1, 6.12 vs. 0.24 for RPS6 and 14.17 vs. 0.12 for HIF1 $\alpha$ . **Conclusion:** Bladder tumors showed lower levels of phosAKT compared to adjacent histologically-benign urothelium, suggesting that phosAKT loss is implicated in bladder oncogenesis. Furthermore, the subset with more intense loss showed significant upregulation of mTOR pathway and HIF1 $\alpha$  gene expression.

**Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 126, Tuesday Morning**

SCHULTZ, L., COUTINHO-CAMILLO, PUGA, R.D., C.M., CASTRO, I., DAMM, G.R., SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., SOARES, F.A.; A miRNA Profile Identifies a Subset of Bladder Cancers with Favorable Prognosis that Are Enriched for phosS6 Overexpression In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.

[1027] A microRNA Profile Identifies a Subset of Bladder Cancers with Favorable Prognosis that Are Enriched for phosS6 Overexpression.

*Luciana Schultz, Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Renato D Puga MSc, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Samuel JT Spagnul, MD, Isabela W Cunha, Dr, MD, PhD and Fernando A Soares Md, PHD.*

*AC Camargo Cancer Center, Pathology, Sao Paulo, Brazil; Hospital Israelita Albert Einstein, Center for Clinical Research, Sao Paulo, Brazil; Universidade de Sao Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil and Instituto de Anatomia Patologica, Santa Barbara d'Oeste, Brazil.*

**Background:** mTOR inhibition is being considered for advanced and cisplatin-resistant bladder cancer. miRNAs have been implicated in mTOR pathway downregulation in a subset of bladder cancers. **Design:** The cohort consisted of 74 patients treated by cystectomy for urothelial carcinoma: 10/74 (14%) pTa/pTis/pT1 21/74 (28%) pT2, and 43/74 (58%) pT3/pT4. Immunohistochemistry was performed for phosS6 (Ser 235/236): 35/74 tumors were negative, 31/74 showed low levels and 8/74 showed high levels (cut-off of 22.5% of positive cells). We applied parametric statistical method t-test with 1000 permutations and p-value <0.05, to identify differentially expressed miRNAs. With these data, we did a hierarchical cluster supported with Pearson correlation that identified two main groups. A miRNA microarray was performed for all tumors. **Results:** Cluster analysis revealed 17 differentially expressed miRNAs, broadly dividing the samples into two groups: one with a miRNA over-expression profile and other with an under-expression signature. Cluster I showed up-regulation of mir-29, mir-130, and mir-518, and Cluster II showed down-regulation of mir-493, mir-125a, mir-320, mir-204 and mir-145. Opposite profiles were observed for mir-382, mir-324, mir-492 and mir-138, which were up-regulated in Cluster I while down-regulated in Cluster II. Seven/8 phosS6 overexpressers belonged to Cluster II. Furthermore, clinic-pathological and outcome differences were significant (p<0.033). Cluster I was composed predominantly of males (75%) 12/42 (29%) patients were younger than 60y, with non-papillary tumors enriched for squamous differentiation. Half (51%) of patients in Cluster II were females 26/31 (84%) patients were older than 60y, often with multifocal tumors (11/31; 35%) enriched with papillary histology. Pathological stage, perineural or vascular invasion, and node or margin status were not significantly different between the two groups. Mean follow-up time (75 percentile) was 8.15 years. Disease-specific survival in Cluster I was 49% while 74% in Cluster II (p=0.028). **Conclusion:** We reveal several miRNAs possibly implicated in mTOR regulation in bladder cancers. Their profile may be able to distinguish a favorable prognostic group, with similar sex distribution and older age group, whose tumors are enriched for phosS6 overexpression, papillary histology and multifocal disease.

**Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 128, Tuesday Morning**

SCHULTZ, L., COUTINHO-CAMILLO, PUGA, R.D., C.M., CASTRO, I., DAMM, G.R., SPAGNUL, S.J.T., CUNHA, I.W., SOARES, F.A.; Overexpression of mTOR Pathway Members Reveals Different microRNA Backgrounds that Can Be Linked by phosS6 In: USCAP Annual Meeting 2015, Boston, Massachusetts. The 104th Annual Meeting Abstracts 2015.

[1029] Overexpression of mTOR Pathway Members Reveals Different microRNA Backgrounds that Can Be Linked by phosS6.

*Luciana Schultz, Claudia M Coutinho-Camillo Ph.D, Renato D Puga MSc, Isac Castro PhD, Gilcy R Damm, Samuel JT Spagnul, MD, Isabela W Cunha, Dr, MD, PhD and Fernando A Soares Md, PHD.*

*AC Camargo Cancer Center, Pathology, Sao Paulo, Brazil; Hospital Israelita Albert Einstein, Center for Clinical Research, Sao Paulo, Brazil; Universidade de Sao Paulo, School of Medicine, Sao Paulo, Brazil and Instituto de Anatomia Patologica, Santa Barbara d'Oeste, Brazil.*

**Background:** PI(3)K/AKT/mTOR/CCND1 pathway alterations have been reported to be frequent and mutually exclusive in urothelial cancer. microRNAs (miRNA) are implicated in mTOR pathway down-regulation in a subset of bladder tumors. **Design:** Immunohistochemistry for pAKT(Ser473), cyclin D1 and pS6 (Ser235/236) was conducted on a well-characterized cohort of 74 urothelial tumors of patients treated by cystectomy and paired peripheral histologically-benign urothelium. Each maker was scored as percent of positive cells and relative expression between malignant and benign samples was calculated by subtraction. A cut-off was reached by ROC curve for the positive tumor samples and higher levels were considered overexpression (high) for pAKT (n=6), cyclin D1 (n=14) and pS6 (n=8). Within this subset, we applied the parametric statistical method t-test with 1000 permutations and p-value <0:05, to identify differentially expressed miRNAs. With these data, we did a hierarchical cluster supported with Pearson correlation. This cluster showed three distinct groups, one been negative expression. A miRNA microarray was then performed. **Results:** Overexpression of pAKT and cyclin D1 were mutually exclusive events, accurately classified by unsupervised cluster analysis (n=20) of the miRNA matrix. Five/8 pS6-high belonged to this group and most of them (4/5) coincided with cyclin D1-high. There were 21 differentially expressed miRNAs, mainly related to tissue differentiation, and also to epithelial-mesenchymal transition, apoptosis and immune response. Up-regulated miRNAs included mir-200 family, mir-20, mir-10 and mir-90 and down-regulated miRNAs included mir-199 family, mir-146 family and mir-150. Cyclin D-high samples were broadly divided into two halves, one of them having a profile that was more similar to that of pAKT-high than the remaining samples, and this subset included all 5 pS6-high tumors. **Conclusion:** Our findings suggest that overexpression of cyclin D1 and pAKT are mutually exclusive in bladder cancer and bare different miRNA epigenetic background. Overexpression of pS6 is frequent in this scenario and more often coincide with overexpression of cyclin D1. This event seems to approach the miRNA profiles of cyclin D1 and pAKT in up-regulated tumors.

**Tuesday, March 24 2015 9:30 AM Poster Session III # 120, Tuesday Morning**