

**ANÁLISE POR IMUNOISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS P53, PRB, HER-2 E CICLINA D1 EM
TUMORES VESICAIS EM PACIENTES
SUBMETIDOS A CISTECTOMIA RADICAL**

SAMUEL JOSÉ TORQUETTI SPAGNUL

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Francisco Paulo da Fonseca

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Spagnul, Samuel José Torquetti

Análise por imunoistoquímica das proteínas p53, pRb, HER-2 e Ciclina D1 em tumores vesicais em pacientes submetidos a cistectomia radical / Samuel José Torquetti Spagnul - São Paulo, 2013. 101p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Francisco Paulo da Fonseca

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA BEXIGA URINÁRIA. 2. CICLINA D1
3. CISTECTOMIA. 4. PROTEÍNA SUPRESSORA DE TUMOR P53
5. IMUNOISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zélia e Luiz. Sempre em primeiro lugar. Sem vocês nada disso seria possível. São meus exemplos de caráter e de luta.

Aos meus filhos, Catarina e João Pedro. Vocês dão sentido a minha vida, com vocês conheci o que é o amor em sua plenitude.

A Fernanda, companheira leal que contorna minhas ausências, mantém coesa nossa família e me estimula como pai, marido e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Francisco Paulo da Fonseca, que me abriu as portas da Pós Graduação e se mostrou um exemplo de profissional dedicado, que exerce com afinco o seu trabalho.

Aos meus familiares, assim mesmo sem especificar nomes. Deste modo não cometo a injustiça de não citar algum de vocês, pois cada um ao seu modo, teve importância ao longo de toda minha trajetória.

À Dra. Luciana Schultz pelas horas dedicadas e pelo empenho, fundamental para a realização deste projeto.

Ao Dr. Gustavo Guimarães pelo apoio, colaboração e compreensão.

Ao Dr. Stenio Zequi pelo apoio e pelos valorosos ensinamentos

À Dra. Isabela Werneck da Cunha pelo apoio e colaboração.

Ao amigo Marcelo Wasano Iwamoto, companheiro da residência de urologia no Hospital Ipiranga e na pós-graduação, sempre a postos nos momentos que precisei.

Aos amigos Augusto Caparica, Celso Milani, Daniel Beltrame e Paula Mendonça Taglietti, amigos que fiz na pós-graduação e que tornaram menos penoso o caminho a ser percorrido.

Aos amigos do Serviço de Urologia do Hospital Ipiranga, sobretudo aos mestres Prof. Dr. Sidney Glina e Dr. Luiz Melo, que tanto estimulam e auxiliam aqueles que passam pelo serviço. Tenho por esta instituição enorme carinho e profundo orgulho em fazer parte deste time.

A querida Fernanda Messeder Moura, que em tempo recorde revisou minha dissertação.

Aos colegas do Serviço de Patologia, que tanto se empenharam para que esse trabalho se concretizasse, principalmente a Dra Stephania e a Gilcy.

A Bibliotecária Suely Francisco, pela prestatividade e enorme competência.

A Ana Paula e toda a equipe da biblioteca, por sua enorme competência e boa vontade.

Por fim, a todos os pacientes a quem tive a honra de cuidar ao longo de minha vida profissional.

RESUMO

Spagnul SJT. **Análise por imunoistoquímica das proteínas p53, pRb, HER-2 e Ciclina D1 em tumores vesicais em pacientes submetidos a cistectomia radical.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O carcinoma urotelial ainda apresenta alta taxa de mortalidade. Assim, marcadores prognósticos são necessários para melhor estratificação dos pacientes para risco de progressão da doença. As proteínas p53, pRb, Ciclina D1 e o HER-2 estão implicadas na progressão e no comportamento invasivo no carcinoma urotelial. Nós investigamos a expressão imunoistoquímica destes marcadores e a sua correlação com o estadió patológico e clínico assim como desfecho clínico. **Métodos:** Lâminas e blocos de parafina foram obtidos em 99 pacientes com carcinoma urotelial tratado por cistectomia radical no Hospital A.C.Camargo no período entre 2000 e 2010. A imunoistoquímica foi realizada para cada marcador em placas de TMA e lâminas inteiras. Os pacientes foram agrupados por estadió patológico (pT) em câncer de bexiga não músculo invasivo CBNMI (pTis/pTa/pT1, n=10), câncer de bexiga músculo invasivo (pT2, n=11) e doença não órgão confinada (não-OC) (pT3/pT4, n=78). Para cada marcador, a expressão alterada foi definida por ponto de corte baseado na comparação com os correspondentes benignos, isto é, os controles. Os dados dos resultados estavam disponíveis em todos os pacientes, como a sobrevida câncer-específica (SCE), a sobrevida global (SG) e a progressão. **Resultados:** A média de idade dos pacientes foi de 67 anos (35-87). Tratamento pré-operatório com BCG foi realizado em 20/99 (20%) pacientes. Expressão alterada de p53, pRb, Ciclina D1 e HER-2 foi observada em 39 (39,39%), 21 (21%), 17 (17%) e 35 (35%) casos, respectivamente. Marcadores da mesma via correlacionados foram o pRb com p53. Os demais marcadores não se correlacionaram entre si. Expressão anormal de

pRb esteve associada à CB não-OC ($p=0,004$) e Ciclina D1 hiperexpressa ($p=0,007$) esteve associada a doença menos agressiva. Coalteração de p53 e pRb esteve presente em 14 tumores, 12 dos quais eram não-OC ($p=0,02$). SG e SCE foram 57,3% e 44,6%, respectivamente (média de 31,3 meses de seguimento). A superexpressão do p53 (escore 4) nos pacientes com CBMI ao diagnóstico foi preditor de SCE ($p=0,02$). Quando analisamos somente o grupo com CBNMI na peça de cistectomia, o HER-2 foi preditor de SCE ($p=0,046$). **Conclusão:** Os marcadores estudados não foram preditores de sobrevida nesta coorte, exceto quando os estratificamos em subgrupos expressivos. Dos marcadores do ciclo celular os que se relacionaram entre si foram o pRb e o p53. A Ciclina D1 hiperexpressa esteve associada a tumores menos agressivos e HER-2 se associou aos tumores não músculo invasivos na peça de cistectomia.

SUMMARY

Spagnul SJT. [Immunohistochemistry analysis of p53, pRb, Erb-2 and Cyclin D1 in bladder tumors in patients undergoing radical cystectomy]. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Invasive urothelial carcinoma still carries a high mortality rate. Reproducible and clinically useful prognostic markers are thus needed for better patient stratification. p53, pRb, cyclin D1 and HER-2 are implicated in progression and invasive behavior in urothelial carcinoma. We investigated the immunohistochemical expression of these markers and correlated them with pathological stage and outcome. **Methods:** Slides and paraffin blocks were retrieved from 99 patients with urothelial carcinoma who were treated by cystectomy in our institution (2000-2010). Immunohistochemistry was performed for each marker on TMA and whole slides. Pathological stage (pT) was grouped in non-muscle-invasive (pTis/pTa/pT1; n=10), invasive-muscle (pT2; n=11) and non-organ-confined (non-OC) (pT3/pT4; n=78). Each marker for altered expression was defined in comparison to the corresponding benign urothelial controls. Outcome data was available in all patients as disease specific survival (DSS), overall survival (OS) and progression. **Results:** The mean patient age was 67 years (35-87). Pre-operative BCG treatment was rendered in 20/102 (19.61%) patients. Altered expression of p53, pRb, cyclin D1 and HER-2 was seen in 39 (39%), 21 (21%), 17 (17%) and 35 (35%) tumor samples, respectively. Markers within the same pathway significantly correlated were pRb and p53. The other markers did not correlate with each other. Pathological stage was predictive of all outcome parameters. Abnormal expression of pRb was associated with non-OC disease (p=0.004) and Cyclin D1 hyperexpressed was associated with less aggressive disease (p=0.007). Co-alteration of p53 and pRb was present in 14 tumors, 12 of which were non-OC (p=0.02). OS and DSS were 57.3% and 44.6%, respectively (mean FU of 31.3 mo). The loss of pRb showed a trend

of progression in superficial tumors ($p=0.07$), whereas overexpression of p53 in patients with muscle-invasive group at diagnosis was predictive of DSS ($p=0.02$). When analyzing but the group with non-muscle invasive group in the cystectomy piece HER-2 was a predictor of SCE ($p=0.046$). **Conclusion:** The markers studied were not predictors of survival in this cohort, except when stratified into subgroups. Of the cell cycle markers that were related to each other were the pRb and p53. Cyclin D1 hyperexpressed was associated with less aggressive tumors and HER-2 was associated with non-muscle invasive tumors in the piece of cystectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias moleculares da tumorigênese do carcinoma urotelial de bexiga e progressão tumoral.....	15
Figura 2	Progressão do ciclo celular controlada pelos complexos protéicos Ciclina-CDKs.....	18
Figura 3	Representação esquemática do modelo da interação entre o pRb e o p53 e regulação pelos complexos Ciclina-CDKs.....	20
Figura 4	Scanner de uma das lâminas de TMA corada em H&E.....	40
Figura 5	Scanner de uma das lâminas de corte inteiro corada em H&E.....	41
Figura 6	Fotomicrografia: imunoexpressão de Ciclina D1 em padrão nuclear, forte e difuso (escore 4).....	42
Figura 7	Fotomicrografia: imunoexpressão de HER-2, em padrão membranoso, completo, forte intensidade, em mais de 30% das células neoplásicas (escore 3).....	43
Figura 8	Fotomicrografia: imunoexpressão de p53, em padrão nuclear, forte e difuso (escore 4).....	44
Figura 9	Fotomicrografia, 40x. imunoexpressão negativa de pRb (escore 0). Controle interno positivo em fibroblastos.....	44

Figura 10	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por tipo histológico: carcinoma urotelial puro (N=74) e carcinoma urotelial com diferenciação (N=25), (p=0,4391).....	58
Figura 11	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer-específica.....	61
Figura 12	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por pT Agrupado (pTa+pTis+pT1, N=19), (pT2, N=23) e (pT3 e pT4, N=55), p=0,0074.....	61
Figura 13	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por pN0 (N=62), pN1 (N=13), pN2 (N=12) e pN3 (N=11), p=0,0179.....	62
Figura 14	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por pN agrupado (N0+N1, N=75) e (N2+N3, N=23), p=0,0018.....	62
Figura 15	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do p53 (escore 0: N=30, escore 1: N=30, escore 2: N=12 e escore 3+4: N=27), p=0,5888.....	76
Figura 16	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado e agrupados do p53 (escore 0 e 1, N=60, escore 2-4, N=39), p=0,9422.....	76
Figura 17	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado da Ciclina D1 (escore 0: N=28, escore1: N= 24, escore 2: N= 23, escore 3: N=15 e escore 4: N=9), p=0,8235.....	77

Figura 18	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado da Ciclina D1 (escore 0-2: N=82, escore 3-4: N= 17), $p=0,3165$	77
Figura 19	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do pRb (escore 0: N=21, escore 2: N= 1, escore 3: N=7 e escore 4: N=70), $p=0,1944$	78
Figura 20	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do pRb (escore 0: N=21, escore 1-4: N= 78, $p=0,7739$	78
Figura 21	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do HER-2 (escore 0: N=64, escore 1: N=17, escore 2: N=12 e escore 3 N=6), $p=0,2024$	79
Figura 22	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do HER-2 (escore 0: N=64, escore 1-4: N=35), $p=0,3459$	79
Figura 23	Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escores positivos agrupados (Sem marcador positivo, N=23, 1 marcador positivo, N=37, 2 marcadores positivos: n=27 e com 3-4 marcadores positivos: N=12), $p=0,5825$	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Indicações da cistectomia radical na coorte estudada.....	35
Tabela 2	Estadiamento patológico dos tumores produtos de cistectomia radical (n=99), segundo a classificação AJCC-TNM/ 2009.....	35
Tabela 3	Distribuição das variáveis anatomopatológicas do espécime da CR.....	36
Tabela 4	Distribuição das doenças associadas dos pacientes portadores de carcinoma urotelial.....	37
Tabela 5	Distribuição do tabagismo na casuística.....	37
Tabela 6	Frequência dos marcadores imunoistoquímicos por escores no tumor e no urotélio normal (controle interno).....	48
Tabela 7	Média, desvio-padrão, mediana e variação dos escores de marcadores imunoistoquímicos no tumor e no urotélio normal.....	50
Tabela 8	Valores dos escores da expressão dos marcadores imunoistoquímicos (citoplasmático e/ou nuclear) considerados alterados nos tumores.....	50
Tabela 9	Progressão clínica por estágio patológico e tempo para progressão. Valor de p para progressao clínica e tempo para progressão clínica (PC).....	55
Tabela 10	Situação clínica final dos pacientes.....	56

Tabela 11	Análise univariada dos parâmetros clínicos, patológicos e de imunoexpressão dos marcadores conforme sobrevida global, SCE e progressão clínica.....	57
Tabela 12	Análise univariada de risco de Cox para prever a sobrevida câncer-específica.....	59
Tabela 13	Análise multivariada de risco de Cox para prever a sobrevida câncer-específica.....	60
Tabela 14	Associação da expressão imunoistoquímica p53 estratificado e agrupado (3+4) por escores dos marcadores moleculares estratificados entre si.....	64
Tabela 15	Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímicos avaliados no espécime da CR nos tumores não músculo invasivos pTa e pTis agrupados e pT1 e dos tumores músculo invasivos do estágio pT2 e dos estágios pT3 e pT4 agrupados.....	66
Tabela 16	Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR nos tumores não músculo invasivos Ta e Tis agrupados e T1 e dos tumores músculo invasivos do estágio T2 e dos estágios T3 e T4 agrupados.....	67
Tabela 17	Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR com os carcinomas uroteliais puros e uroteliais com diferenciação histológica, com extensão da doença órgão confinada e não órgão confinado e com a progressão clínica.....	69

Tabela 18	Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico avaliados no espécime da CR com a progressão clínica pós-CR.....	71
Tabela 19	Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR com a progressão clínica após a cirurgia.....	72
Tabela 20	Análise univariada dos parâmetros clínicos, patológicos e de imunoexpressão dos marcadores conforme sobrevida global, SCE e progressão clínica.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Organização Mundial da Saúde (OMS). Consenso OMS/ISUP (International Society of Urological Pathology) – Graduação histológica.....	8
Quadro 2	Subtipos e variantes de carcinoma uroteliais.....	8
Quadro 3	Classificação TNM 2009 dos tumores de bexiga.....	9
Quadro 4	Critérios clínicos e anatomopatológicos para estimar as chances de recidiva e progressão tumoral nos tumores não músculo invasivos.....	10
Quadro 5	Padronização dos anticorpos submetidos à imunoistoquímica.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

CB	Câncer de bexiga
CBMI	Câncer de bexiga músculo invasivo
CBNMI	Câncer de bexiga não músculo invasivo
CIS	Carcinoma in situ
CR	Cistectomia radical
CU	Carcinoma urotelial de bexiga
Hb	Hemoglobina
HER-2	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IMH	Imunoistoquímica
OC	Órgão confinado
p53	Proteína p53
pRb	Proteína do retinoblastoma
Qtx	Quimioterapia
RTU-b	Ressecção transuretral de bexiga
Rx	Radiografia
RXt	Radioterapia
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLP	Sobrevida livre de progressão
SCE	Sobrevida câncer-específica
TMA	Tissue MicroArray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Fatores de risco	2
2	DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO	4
2.1	Diagnóstico	4
2.2	Estadiamento	5
3	PATOLOGIA	7
4	PROGNÓSTICO	9
5	TRATAMENTO	11
5.1	Câncer de bexiga não músculo invasivo (CBNMI)	11
5.2	Câncer de bexiga músculo invasivo (CBMI)	12
6	MARCADORES MOLECULARES	14
6.1	p53 e o câncer de bexiga	20
6.2	pRb e o câncer de bexiga	24
6.3	Ciclina D1 e o câncer de bexiga	26
6.4	HER-2 e o câncer de bexiga	28
7	OBJETIVOS DO TRABALHO	31
8	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	32
8.1	Material	32
8.1.1	Critérios de inclusão	32
8.1.2	Critérios de exclusão	33
8.2	Casuística	33

8.3	Método.....	38
8.3.1	Construção do TMA e obtenção dos cortes inteiros	39
8.3.2	Avaliação da expressão das proteínas p53, pRb, HER-2 e Ciclina D1 por imunistoquímica	45
8.3.3	Critérios para obtenção dos pontos de corte considerados positivos para os marcadores estudados	46
8.4	Análise estatística.....	50
9	RESULTADOS.....	53
9.1	Resultados clínicos e patológicos.....	53
9.2	Resultados relacionados aos marcadores.....	63
10	DISCUSSÃO	81
11	CONCLUSÃO	90
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ANEXO

Anexo 1 Ficha de Levantamento

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer de bexiga (CB) é o nono tumor mais frequente no mundo, com 330.000 novos casos diagnosticados a cada ano e 130.000 mortes relacionadas (PLOEG et al. 2009). Atualmente é o quarto tumor mais freqüente em homens e o nono entre as mulheres, nos Estados Unidos. Sua taxa de incidência apresentou um leve aumento desde os anos 80, tendo sido acompanhado, porém, de queda nas taxas de mortalidade. Seu pico de incidência encontra-se entre a 6ª e 7ª décadas de vida, raramente acometendo pacientes jovens. Dificilmente ocorre de modo silencioso, o que justifica o fato de ser raramente encontrado incidentalmente em necropsias, diferentemente do tumor de próstata (JEMAL et al. 2005).

No ano de 2012, estimam-se, para o Brasil, 6.210 casos novos de CB em homens, o que configura a sétima neoplasia mais prevalente no sexo masculino no nosso meio (3,2% de todos os cânceres). Entre as mulheres, o CB não figura entre as neoplasias mais frequentes, sendo previstos, no Brasil, 2.690 novos casos no mesmo período (Ministério da Saúde 2011).

1.2 FATORES DE RISCO

- **Tabagismo**

A associação tabaco-câncer de bexiga é bastante conhecida e os metabólitos presentes no cigarro são responsáveis por 50% dos tumores vesicais, sendo os tabagistas quatro vezes mais afetados do que a população geral (MESSING 2002). A incidência do CB está diretamente ligada ao tempo de exposição ao tabaco e ao número de cigarros fumados por dia (BRENNAN et al. 2000).

- **Exposição a carcinógenos**

Depois do tabagismo, a exposição aos carcinógenos é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CB. Os derivados do benzeno encontrados na indústria de produtos têxteis, tintas e química são conhecidos carcinógenos envolvidos na gênese do CB (PASHOS et al. 2002).

- **Radioterapia (Rtx)**

A associação da Rtx com CB é conhecida e geralmente segue tratamentos de radioterapia pélvica para tratamento de neoplasias pélvicas (CHROUSER et al. 2005). Verifica-se um risco aumentado de pacientes submetidos à Rtx desenvolverem CB, inclusive para o tratamento do carcinoma de próstata (NIEDER et al. 2008).

- **Outros**

Uso de dispositivos intravesicais (LOCKE et al. 1985) e infecção por *Schistosoma haematombium*, ambos associados ao carcinoma de células escamosas (CEC) de bexiga (MESSING 2002).

2 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO

2.1 DIAGNÓSTICO

- **Sintomatologia**

Estima-se que 10% dos pacientes com hematúria microscópica e 25% dos que apresentam hematúria macroscópica tenham algum tipo de tumor geniturinário, sendo o CB o mais comum. A manifestação clínica mais comum do tumor de bexiga é a hematúria macroscópica indolor (KHADRA et al. 2000).

- **Cistoscopia**

O padrão ouro para o diagnóstico do CB é a cistoscopia. O achado de lesão vesical compatível com tumor na cistoscopia apresenta correlação anatomopatológica em 90% dos casos. A cistoscopia também deverá ser o método de seguimento desses pacientes (CINA et al. 2001). O uso de métodos fotodinâmicos pode ser um importante fator para a identificação e avaliação de áreas de carcinoma *in situ* (CIS) (STENZL et al. 2010).

- **Citologia urinária**

A citologia urinária é usualmente empregada tanto no diagnóstico de pacientes com suspeita de CB quanto no seguimento após terapêutica, com

sensibilidade de 35% e especificidade de 94% (BROWN 2000; HALLING et al. 2000).

- **Ressecção transuretral de bexiga (RTU-b)**

O diagnóstico definitivo é realizado por meio de ressecção transuretral (RTU-b) sob anestesia, com retirada em separado de material da base da lesão (camada muscular própria/músculo detrusor) para análise patológica, a fim de determinar o nível de invasão. Biópsias aleatórias deverão ser realizadas somente na presença de área suspeita para CIS ou nos casos com citologia urinária positiva (área com hiperemia e aspecto mais elevado do urotélio). Na suspeita de CIS, biópsias de uretra prostática também devem ser realizadas (VAN DER MEIJDEN et al. 1999).

Há um risco de 33-53% de doença residual após a primeira RTU-b, o que justifica, em casos selecionados, uma segunda RTU-b (JAHNSON et al. 2005).

2.2 ESTADIAMENTO

O estadiamento se faz para avaliar a extensão local do tumor e a pesquisa de metástases. Entretanto, a acurácia no estadiamento do tumor vesical pela tomografia computadorizada (TC) é de 55% (KIM et al. 2004) e a ressonância magnética (RM) falha em detectar metástases linfonodais em 15% dos pacientes (PAIK et al. 2000).

A radiografia de tórax (Rx) deve ser realizada rotineiramente na pesquisa de metástases pulmonares, podendo ser, eventualmente, complementada com TC no caso de lesões suspeitas ao Rx (KIM et al. 2004).

O uso da cintilografia óssea para pesquisa de metástase óssea só é empregado em casos suspeitos, não devendo ser realizado rotineiramente, visto que a probabilidade de ser encontrado acometimento ósseo por metástase é baixa, em torno de 5% (BRISMAR e GUSTAFSON 1988; HAIN e MAISEY 2003).

A presença de lesão tumoral no trato urinário alto acompanhando o CB cursa em torno de 4% (HERRANZ-AMO et al. 1999), sendo que nos tumores de alto grau histológico localizados na região trigonal a concomitância pode chegar a 10% (MESSING 2002; OOSTERLINCK 2004). Sendo assim, o rastreamento de tumor do trato superior fica restrito a pacientes considerados de alto risco (KIM et al. 2004).

3 PATOLOGIA

Os tumores de bexiga são na maioria dos casos derivados do urotélio. Estima-se que em mais de 90% dos casos a histologia corresponda a carcinoma de células uroteliais (CU). Os demais tipos histológicos são raros, sendo o carcinoma de células escamosas (CEC) responsável por cerca de 7% dos casos, e esses, por sua vez, estando altamente relacionados à metaplasia escamosa causada por irritação do urotélio por cálculos, cateteres e agentes infecciosos como o *Schistosoma haematobium*. O adenocarcinoma é achado em torno de 2% dos casos e tem associação com extrofia vesical e persistência do úraco. Outras formas de tumores vesicais são extremamente raras, como os sarcomas de bexiga (MESSING 2002).

Cerca de 70% dos casos de CB são diagnosticados inicialmente como doença não músculo invasiva (CBNMI), por não invadirem a muscular própria da bexiga; 30% apresentam ao diagnóstico doença músculo invasiva (CBMI) (VAIDYA et al. 2001).

A graduação histológica atualmente adotada é a da Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 1998, o consenso OMS/ISUP (*International Society of Urological Pathology*) propôs nova classificação de grau histológico com melhor correlação clinicopatológica, dividindo os tumores de bexiga em tumores de alto e baixo grau de diferenciação celular, modificada em 2004 (EPSTEIN et al. 1998; SAUTER et al. 2004).

Quadro 1 - Organização Mundial da Saúde (OMS). Consenso OMS/ISUP (*International Society of Urological Pathology*) – Graduação histológica

Organização Mundial da Saúde (OMS). Consenso OMS/ISUP (<i>International Society of Urological Pathology</i>) – Graduação histológica
1973 – Graduação da WHO
Papiloma urotelial
Grau 1: bem diferenciado
Grau 2: moderadamente diferenciado
Grau 3: pouco diferenciado
2004 - Graduação da WHO
Papiloma urotelial
Neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial maligno
Carcinoma urotelial papilífero de baixo grau
Carcinoma urotelial papilífero de alto grau

Os subtipos morfológicos podem ser importantes para prognóstico da doença e para tratamento. Atualmente, as seguintes diferenciações são usadas (Quadro 2):

Quadro 2 - Subtipos e variantes de carcinoma uroteliais

Tipos de carcinomas uroteliais
Urotelial (mais de 90% dos casos)
Urotelial com diferenciação epidermóide
Urotelial micropapilífero
Urotelial com diferenciação trofoblástica
Carcinoma de pequenas células
Carcinoma variante em “ninhos”
Carcinoma de células fusiformes-sarcomatóide

Fonte: WASCO et al. (2010)

4 PROGNÓSTICO

O estadiamento patológico do CB segue critérios internacionais de padronização. Abaixo o sistema TNM, da União Internacional Contra o Câncer 2009 (SOBIN et al. 2010).

Quadro 3 - Classificação TNM 2009 dos tumores de bexiga

Classificação	T- Tumor primário
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : “tumor plano”
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor que invade o músculo
T2a	Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna)
T2b	Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade o tecido perivesical
T3a	Microscopicamente
T3b	Macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal
T4a	Tumor que invade próstata, útero ou vagina
T4b	Tumor que invade parede pélvica ou abdominal
N- Gânglios linfáticos	
Nx	Gânglios linfáticos não avaliados
N1	Metástase em um único gânglio na pelve menor (hipogástrica, obturatória, ilíaca externa ou pré-sacral)
N2	Metástase em múltiplos gânglios na pelve menor (hipogástrica, obturatória, ilíaca externa ou pré-sacral)
N3	Metástase em gânglio da cadeia ilíaca comum
M- Metástase à distância	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: SOBIN et al. (2010)

Os CB apresentam critérios clínicos e patológicos que, somados, são capazes de prever recidiva e progressão tumoral.

Quadro 4 - Critérios clínicos e anatomopatológicos para estimar as chances de recidiva e progressão tumoral nos tumores não músculo invasivos

Grupo de risco dos tumores não músculo invasivo de bexiga		
Baixo risco	Risco intermediário	Alto risco
Tumor < 3 cm	Tumor > 3 cm	Tumor > 3 cm
Único	Único ou múltiplo	Múltiplo
Baixo grau	Baixo grau	Alto grau
PTa	pTa	pT1
Ausência de CIS	Ausência de CIS	Presença de CIS

Fonte: Sociedade Brasileira de Urologia-SBU (2009)

Os CBNMI apresentam alta probabilidade de recorrência, em torno de 60%. A progressão para a doença músculo invasiva ocorre em 10-20% (FRADET e LACOMBE 2000). A recorrência (persistência) do tumor em 9 meses após terapia com BCG esteve associada com progressão e óbito por câncer em 30% dos casos (MERZ et al. 1995). Quando a recidiva ocorreu, em 3 meses a progressão para CBMI foi de 80% (SOLSONA et al. 2004).

O CIS primário confinado à bexiga é tratado com BCG, obtendo-se uma taxa de resposta completa de até 93%. No entanto, o CB com CIS associado apresenta até 50% de progressão para CBMI (LOSA et al. 2000). A presença isolada de CIS classifica a lesão como sendo de alto risco para recorrência, com taxas que variam de 63 a 92% (HENEY 1992).

5 TRATAMENTO

5.1 CÂNCER DE BEXIGA NÃO MÚSCULO INVASIVO (CBNMI)

A recorrência e progressão do CBNMI estão fortemente associadas ao grau da lesão e à presença de infiltração da lâmina própria. A progressão tumoral varia de 6 a 25% em pTa e de 27 a 48% no pT1 (BRAUERS et al. 2001).

O subestadiamento em CBNMI é variável, podendo chegar a até 60%. Esses autores associam o achado a múltiplas recorrências pré-cistectomia e à não realização de Re-RTU-b (STEIN et al. 2001). HERR (1999) encontrou 49% de CBMI que foram inicialmente diagnosticados com CBNMI. Os tumores pTa e pT1 têm tratamento padrão com ressecção endoscópica do tumor associados ou não à terapia intravesical adjuvante. No entanto, a cistectomia nos pacientes com tumores T1 vem sendo aplicada em tumores multicêntricos, grandes e com CIS concomitante (OOSTERLINCK et al. 2002).

A cistectomia precoce no CBNMI, especificamente no T1 alto grau, foi benéfica para aumentar a sobrevida global em 10 anos de 50 a 60% para 90% naqueles casos que foram inicialmente diagnosticados com CBNMI e que progrediram para CBMI ao longo de 2 anos (HERR e SOGANI 2001).

Há evidências concretas de que a terapia com BCG previne a recorrência, porém não a progressão do CB (SYLVESTER et al. 2010).

5.2 CÂNCER DE BEXIGA MÚSCULO INVASIVO (CBMI)

O tratamento padrão para os CBMI é a cistectomia radical com linfadenectomia regional. No entanto, se analisarmos todos os pacientes que se submetem à CR, somente 50% estarão vivos após 5 anos (STEIN e SKINNER 2006).

A técnica da cistectomia envolve a retirada da bexiga e de órgãos adjacentes; no homem, a próstata e as vesículas seminais e, nas mulheres, frequentemente, o útero e anexos. A uretrectomia deverá ser realizada se houver margens positivas ao nível da uretra, se o tumor primário invadir o colo vesical (em ambos os sexos) ou em casos de invasão extensa da próstata (HAUTMANN et al. 2007). A linfadenectomia padrão no CB inclui a remoção dos tecidos linfonodais cranialmente a bifurcação dos vasos ilíacos, a fossa obturadora e os linfonodos pré-sacrais. A linfadenectomia alargada se estende até a bifurcação da aorta (MILLS et al. 2007).

As invasões vasculares e linfáticas se comportam como fatores independentes de prognóstico (LEISSNER et al. 2003). Há trabalhos que mostram que a densidade linfonodal, ou seja, a quantidade de linfonodos acometidos em relação aos linfonodos ressecados é importante para melhor estadiamento do estágio N (JENSEN et al. 2011). HERR et al. (2004) demonstraram que a retirada de mais de dez linfonodos reduz a possibilidade de recorrência pélvica em cinco vezes e duplica as chances de sobrevida em cinco anos.

Em pacientes com CBMI, o retardo em indicar a CR pode acarretar aumento de casos com doença não órgão confinada. CHANG et al. (2003) demonstraram que o retardo em 3 meses na realização da CR elevou de 51% para 82% a incidência de doença não órgão confinada.

A reconstrução do trato urinário pode ser feita por derivação urinária incontinente com seguimento intestinal, geralmente seguimento ileal (Cirurgia de Bricker) ou com reservatório ortotópico continente, a neobexiga ortotópica. Quando se planeja reconstrução ortotópica continente, é fundamental a análise das margens uretrais, pois o comprometimento por tumor (invasivo ou carcinoma *in situ*) diminui a sobrevida livre de doença (HUGUET et al. 2005).

A CR é uma cirurgia agressiva que envolve até 3% de mortalidade imediata e morbidade perioperatória próximo a 30% em centros de referência com alto volume cirúrgico e com cirurgião experiente (STEIN e SKINNER 2006).

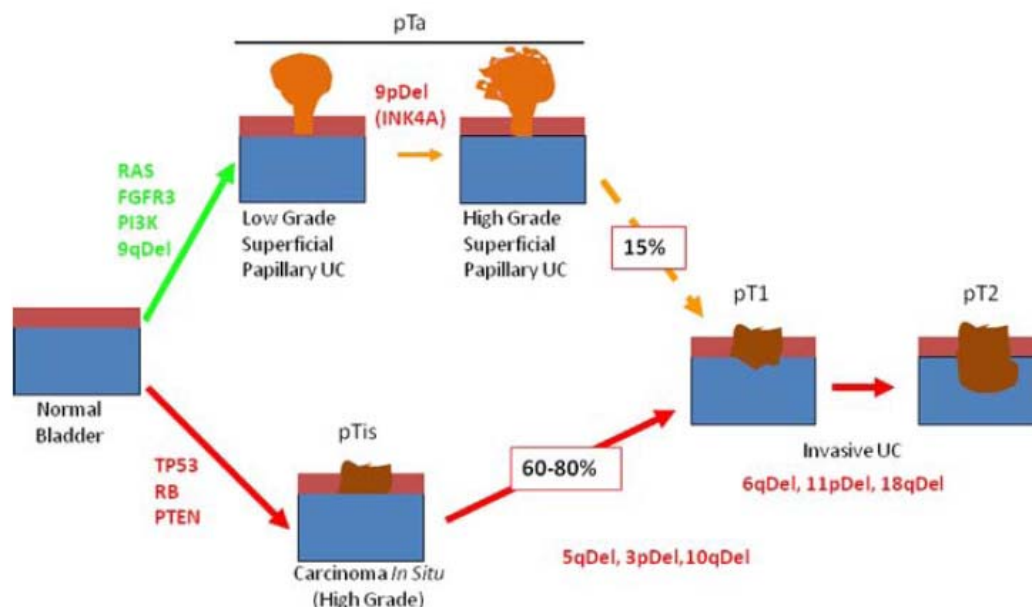
6 MARCADORES MOLECULARES

Os tumores iniciais de bexiga seguem a duas vias de tumorigênese bem estabelecidas e distintas.

A primeira via, dos carcinomas não músculo invasivos, corresponde à formação de tumores de aspecto papilar, pouco agressivos, com elevado potencial de recidiva, porém com baixa capacidade de progressão. Esta via é caracterizada pela mutação nos oncogenes H-RAS, FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3), PI3K e por deleções no braço longo do cromossomo 9 (9q).

A segunda via, dos carcinomas músculo invasivos, é marcada pelo desenvolvimento do CIS, lesão considerada de alto risco para progressão para doença invasiva. Neste seguimento encontramos mutações e perda de função dos genes supressores tumorais P53, RB e PTEN (CASTILLO-MARTIN et al. 2010). Essas mutações geram instabilidade genética e produzindo um fenótipo anti-apoptótico de modo que proliferação celular ocorra de modo incoordenado (CORDON-CARDO 2008).

Baseado neste modelo, a progressão do CB vem sendo proposta em 2 vias genéticas distintas, conforme exposto na Figura 1.



Fonte: CASTILLO-MARTIN et al. (2010)

Figura 1 - Vias moleculares da tumorigênese do carcinoma urotelial de bexiga e progressão tumoral. Os tumores de bexiga são classificados em duas vias separadas com padrões histopatológicos, moleculares e comportamento clínico distintos.

Ao longo dos últimos 20 anos o estudo das vias moleculares associadas ao surgimento e desenvolvimento das neoplasias vesicais tem apresentado um grande avanço (SHARIAT et al. 2008). A presença de expressão de certas proteínas no CB pode distinguir aquele de padrão biológico mais grave, bem como prever quais pacientes deveriam receber um tratamento mais agressivo precocemente como quimioterapia adjuvante ou mais recentemente terapia de alvos moleculares (SHARIAT et al. 2008; CASTILLO-MARTIN et al. 2010). Baseados nestes achados muitos trabalhos envolvendo os marcadores moleculares, sobretudo aqueles envolvidos com o ciclo celular, foram desenvolvidos.

As proteínas relacionadas ao ciclo celular conferem estabilidade celular, sendo que suas alterações podem promover o surgimento de neoplasias. Elas podem ser quantificadas indiretamente através da IMH, a fim de estimar o comportamento destes tumores (SHARIAT et al. 2008; CASTILLO-MARTIN et al. 2010) ou através de técnicas de análise direta do DNA como o FISH (Fluorescent *in situ* hybridization).

As neoplasias são caracterizadas pela proliferação celular desordenada. A proliferação celular de modo ordenado se deve a manutenção adequada do ciclo celular. O controle do ciclo se deve ao complexo de proteínas, Ciclinas- kinases dependentes de Ciclinas (cdk), onde as cdks funcionam como uma unidade catalítica das Ciclinas. Esse complexo é regulado pela fosforilação de proteínas chaves que são codificadas pelo gene do Retinoblastoma (RB).

Manter esse mecanismo de proliferação celular intacto é função dos genes supressores tumorais, marcadamente os mais estudados p53 e Rb.

Múltiplas Ciclinas têm sido descritas com atuação em diferentes fases do ciclo celular.

Notemos na Figura 2 os diferentes sítios de atuação dos complexos Ciclina-cdk, notadamente da Ciclina D- cdk4 atuando no controle da fase G1 da mitose.

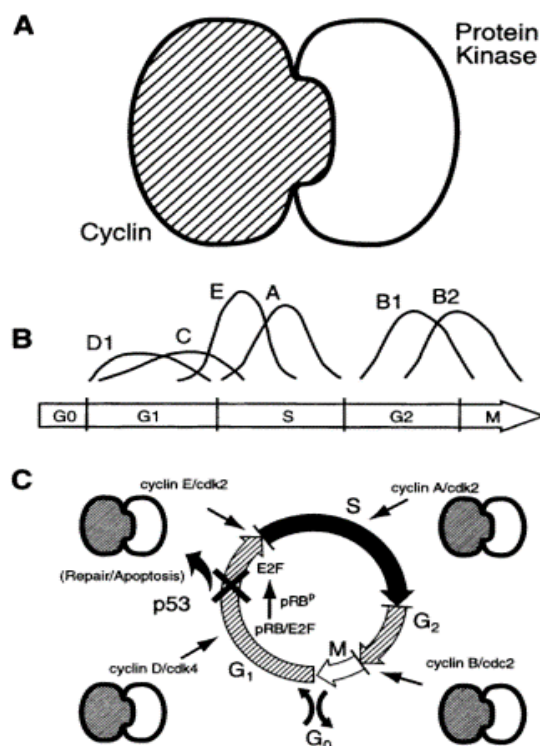
O p53, uma proteína codificada pelo gene “supressor tumoral” (TP53) localizado no cromossomo 17 (17p13.1) que tem como função controlar um dos checkpoints do ciclo celular, atuando como protetor da integridade genômica. Ele impede a proliferação celular após a fase G1 caso haja danos

a integridade do DNA. A mutação do gene p53 está presente em metade das neoplasias humanas (LEVINE 1997).

O RB é um gene localizado no cromossomo 13 (13q14) e assim como o p53, também é intitulado um gene supressor tumoral. O gene RB sintetiza a proteína pRb. A quantidade de pRb não se altera durante a progressão do ciclo celular. O estado de fosforilação de pRB é dependente do ciclo celular e é um alvo para a atividade enzimática do complexo Ciclina-cdk. Ou seja, este complexo atua fosforilando o pRb de modo a inativá-lo (CHATTERJEE et al. 2004).

O pRb permanece na forma não fosforilada na fase G1 da mitose e após progressão para a fase S se tornam altamente fosforilado e assim permanece na fase G2. Acredita-se que a fase ativa do pRb é a forma não fosforilada, mantendo o controle do ciclo celular nas fases G0-G1. O pRb se mantém estável através da ligação com proteínas da família das E2F, um fator de transcrição, localizados em genes responsáveis pela indução da fase S.

Esses achados sugerem que a E2F atuam como ponto de restrição das fases G1-S. A perda de heterozigose, mutações e deleções do gene RB geralmente resulta em perda da expressão da proteína pRb (CORDON-CARDO 1995).



Fonte: CORDON-CARDO (1995)

Figura 2 - Progressão do ciclo celular controlada pelos complexos protéicos Ciclina-CDKs. A- Complexo Ciclina-cdk. B- Ciclinas e seus sítios de atuação durante as fases do ciclo celular. C- Nota-se o p53 como check-point em G1. O dano ao DNA estimula o acréscimo de p53 que desencadeia a apoptose. Há também a ligação de pRb-E2F, o Rb uma vez fosforilado eleva os níveis de E2F promovendo a migração para a fase S da mitose

O p53 e o pRb, se relacionam durante o ciclo celular através da ação de dois outros genes, o MDM2 e o p21 (também denominado WAF1).

Através do esquema abaixo, representado pela Figura 3 fica clara a inter-relação entre o p53 e o pRb no controle do ciclo celular, apoptose e progressão tumoral.

Acredita-se que a perda de função de um gene supressor tumoral, seja compensada pela atividade elevada de outro gene supressor, com o intuito de proteger o mecanismo de divisão celular. Quando ambos estão

inativos, na forma fosforilada, o fator de transcrição E2F perde a inibição e passa a estimular a proliferação celular desordenada (MORGENBESSER 1994).

A co-mutação de pRb-p53 acontece em cerca de 50-60% dos CBMI e determinam um prognóstico desfavorável a esse grupo de pacientes.

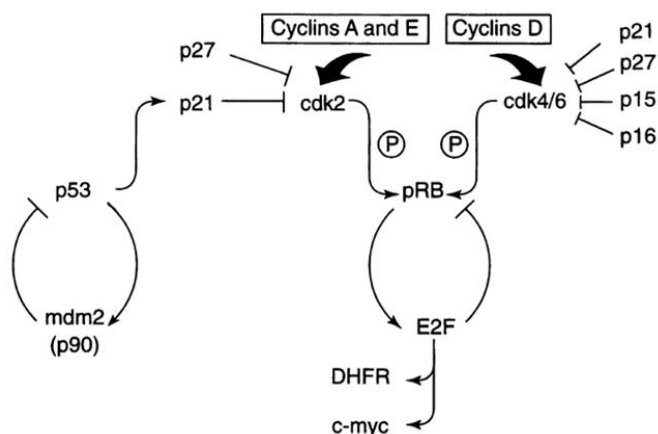
A perda de expressão do pRb promove uma intensa resposta apoptótica mediada por p53. Esse achado explica o porquê das células que apresentam a mutação dos dois genes, serem muito mais susceptíveis aos agentes genotóxicos (HE et al. 2009).

A mutação p53 resulta em acúmulo de p53 nuclear, que se manifesta na imunoistoquímica como hiperexpressão. O pRb mutado geralmente se expressa como ausência de expressão à imunoistoquímica. No entanto há demonstrações claras de que a via do pRb alterada também pode se manifestar através da hiper-expressão do Rb. A hiperexpressão pode corresponder ao pRb hiperfosforilado que em muitos casos pode decorrer da Ciclina D1 hiperexpressa e/ou deleção de p16 (CHATTERJEE et al. 2004).

As Cdk-i, conhecidas como reguladores negativos do ciclo celular são moléculas sintetizadas pelos genes CKI. Sua função é formar complexos estáveis com as unidades catalíticas cdk, inibindo sua ação sobre as Ciclinas. Desta classe de proteínas, a mais conhecida e estudada é o p21, também chamado de WAF1, porém outros merecem destaque como o p27, p16 e p15.

No ponto de restrição G1-S, o p53 em resposta ao dano celular, induz a transcrição do gene Waf-1(p21) que por sua vez sintetiza a proteína p21,

uma importante inibidora do cdk. O p21 se liga e inativa o complexo Ciclina-cdk, promovendo acúmulo de pRb hipofosforilado, que bloqueia o ciclo celular (SHERR e ROBERTS 1999).



Fonte: CORDON-CARDO (1995)

Figura 3 - Representação esquemática do modelo da interação entre o pRb e o p53 e regulação pelos complexos Ciclina-CDKs. O p21 é regulado pelo p53 e é inativa os complexos Ciclina E-cdk2, Ciclina A-cdk2 e Ciclinas D1, D2 e D3-cdk4. Ao fazer isso também inibem a fosforilação do pRb; p27 inativa os mesmos complexos que o p21; p16 e p15 tem suas atividades restritas aos complexos Ciclina D-cdk4/6.

6.1 p53 E O CÂNCER DE BEXIGA

A proteína p53 foi descrita pela primeira vez em 1979, enquanto se fazia pesquisas com o vírus SV40 (Simian Vírus) e foi classificado inicialmente como um antígeno tumoral (LINZER e LEVINE 1979).

O seu papel como supressor tumoral foi descoberto somente 10 anos depois, quando foi demonstrada sua capacidade de suprimir a

transformação celular por oncogenes e inibir o crescimento de células mutadas (FINLAY et al. 1989).

A mutação do p53, no CBNMI é muito menos frequente que nos CBMI. No entanto, quando presente no CBNMI, o p53 está relacionado com pior grau histológico, maiores chances de recorrência, de progressão e piores taxas de sobrevida (SMITH et al. 2003).

A metodologia para a análise imunoistoquímica do p53 carece de padronização. Alguns centros, como o Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, adotam como imunoexpressão positiva para o p53 ao menos 20% dos núcleos corados, porém a maior parte dos trabalhos que levantamos demonstrava o ponto de corte em 10% (SMITH et al. 2003).

Os trabalhos em CB, avaliando a expressão do p53 apresentam casuísticas muito distintas e grupos heterogêneos. A fim de melhor estratificar os grupos estudados, subdividimos os casos por estágio patológico.

- **p53 no CBNMI:**

- ✓ **pTa:** CASETTA et al. (1997) adotaram um ponto de corte para a marcação do p53 em 5% e não encontraram diferença com relação a progressão para CBMI comparado àqueles que não expressavam p53 em pacientes com pTa.

Já HOLMANG et al. (2001) encontraram no subgrupo de pacientes com TaG2 maior taxa de progressão naqueles que expressavam o p53.

✓ **pT1:** Diferente do pTa que apresenta escassez de trabalhos na literatura a respeito da influência da mutação p53 nesse grupo, no T1 a literatura é vasta. SARKIS et al. (1993) demonstraram que a mutação do p53 foi fator determinante para a progressão para CBMI em 43 pacientes pT1. Nesta amostra, foi adotado o ponto de corte de 20%. Os pacientes que expressavam mais que 20% dos núcleos marcados por p53 progrediram significativamente mais que aqueles expressavam menos de 20%.

ESRIG et al. (1994) encontraram associação entre p53 positivo com pior taxa de sobrevida pós CR em pacientes com CB em estágio pT1.

✓ **CIS:** É comum o achado de p53 positivo naqueles tumores que apresentam CIS. SARKIS et al. (1994) encontraram 48% de p53 positivo (acima de 20% dos núcleos marcados) em uma amostra de 33 pacientes estudados. Este grupo apresentou 86,7% de progressão para CBMI, frente a 16,7% dos que não apresentavam hiperexpressão do p53.

- **p53 no CBMI:**

A maioria dos trabalhos que estudam a relação da mutação do p53 com CBMI. Pesquisadores do International Study Initiative on Bladder Cancer, envolvendo 25 centros de oncologia, avaliaram a presença da mutação do p53 em CB. Em 1706 pacientes avaliados foi encontrada expressão elevada do p53 em 23% dos casos. Vinte e cinco por cento dos pacientes com CBNMI e 48% dos pacientes com CBMI apresentaram p53 positivo à imunoistoquímica (SCHMITZ-DRAGER et al. 1999).

Conforme já descrito, a progressão da doença está relacionada com a mutação dos genes supressores tumorais P53 e RB no CB. Portanto, o achado de mutação do p53 neste grupo de pacientes é evento esperado (CASTILLO-MARTIN et al. 2010).

São vários os trabalhos publicados demonstraram a significância do p53 em prever mortalidade e recorrência (ESRIG et al. 1994).

HERR et al. (1999) encontraram a hiperexpressão de p53 como fator preditivo independente de sobrevida em pacientes com doença órgão confinada submetidos a CR.

SHARIAT et al. (2010) estudaram pacientes com doença não órgão confinada (pT3 e pT4), submetidos a cistectomia e avaliaram a expressão do p53. Nessa amostra foram incluídos 692 pacientes e considerados p53 positivo em 341 pacientes (49,3%) quando mais de 10% dos núcleos expressavam p53. Na análise multivariada o p53 foi significativamente associado a pior sobrevida e maiores taxas de recidiva clínica. Os pacientes com p53 hiperexpresso tinham 1,6 vezes mais chances de recidiva e de morrer por CB que o grupo considerado p53 negativo.

A pesquisa de mutações em marcadores associados, sobretudo aqueles que estão envolvidos com a mesma via de tumorigênese vem ganhando espaço no cenário científico mundial. SHARIAT et al. (2009) testaram os marcadores p53, p21, survivina, pRB, p27 e Ki-67 em produtos de cistectomia radical em pacientes com estágio pT1 e demonstraram que a alteração na expressão de p53, p27 e Ki-67 se associava a maior recidiva e mortalidade câncer-específica. Na análise multivariada, invasão

linfovascular, metástase linfonodal, grau patológico e a presença concomitante dos 3 marcadores alterados foram considerados fatores de risco independente para recidiva tumoral e mortalidade câncer-específica. Aqueles que tiveram os 3 marcadores alterados apresentaram 24 vezes mais chances de recidiva tumoral e 27 vezes mais chances de morrer em decorrência do CB do que aqueles que não tinham nenhum desses marcadores alterados.

6.2 pRb E O CÂNCER DE BEXIGA

O gene de suscetibilidade ao retinoblastoma (RB) codifica uma fosfoproteína nuclear (pRB) que funciona como um regulador negativo do ciclo celular. Foi documentado que os tumores que abrigam supressões do RB apresentavam níveis indetectáveis da proteína pRb e foram associados com prognóstico reservado e um comportamento clínico agressivo. A presença de alterações no gene RB é frequente em tumores de alto grau e CIS (CASTILLO-MARTIN et al. 2010). Estima-se que metade dos pacientes com CBMI apresente mutação no gene RB (HE et al. 2009).

Como a expressão nuclear do Rb indica que o gene do Rb está intacto, muitos trabalhos consideram nos achados de imunoistoquímica somente a marcação ou a ausência de marcação do pRb. No entanto estes autores consideram a possibilidade do gene apresentar perda parcial da sua atividade e ainda assim manter sua expressão (COTE et al. 1998).

Assim como o p53, o Rb mutado também está associado a via tumoral envolvida na gênese do CB, sobretudo nas formas mais agressivas da doença (CASTILLO-MARTIN et al. 2010).

COTE et al. (1998) avaliaram a imunoexpressão do pRb em 185 casos de CB submetidos a CR por CBMI. A expressão do pRb foi estratificada em 3 grupos: 0, 1+ e 2+ sendo respectivamente ausência total de marcação, até 50% dos núcleos expressos e acima de 50% dos núcleos expressos. Os casos com escore 0 (30%) e 2+ (26%) apresentaram curvas idênticas de sobrevida e recorrência. Todos controles apresentaram marcação no escore 1+.

Discute-se que a superexpressão da Ciclina D1 e deleção do p16 podem inibir a ação do pRb, promovendo uma hiperfosforilação que gera marcação forte à imunoistoquímica, o que explica o motivo da hiperexpressão do pRb naqueles casos onde o gene esta mutado.

Quando analisados as curvas de sobrevida e recorrência aqueles que expressavam fortemente o pRb (2+) e os que não expressavam Rb (escore 0) tiveram pior grau histológico, estágio linfonodal mais avançado, menor sobrevida câncer específica e maiores taxas de recorrência, na análise multivariada (COTE et al. 1998).

SHARIAT et al. (2012) analisaram 272 pacientes submetidos a CR por CB nos estádios T1 e T2. Foram analisados os marcadores p53, pRb, p21 e p27. O pRb mutado foi considerado quando não houve expressão ou quando houve forte expressão (>50% dos núcleos corados). Nesta amostra, o pRb

alterado esteve associado com pior sobrevida câncer específica ($p < 0,001$) e maiores taxas de recidiva clínica ($p < 0,001$).

No entanto o achado mais importante deste estudo é que a associação de marcadores quando positivos foi preditor de sobrevida e recorrência, de modo que nos casos onde mais do que 3 marcadores foram positivos as taxas de sobrevida global foram mais baixas e a recidiva clínica mais frequente com significância estatística (SHARIAT et al. 2012).

6.3 CICLINA D1 E O CÂNCER DE BEXIGA

A Ciclina D1 foi originalmente isolada no oncogene PRAD-1 e conhecida por estar translocada e super-expressa em linfomas de células B (ROSENBERG et al. 1991).

A Ciclina D1, em associação com sua cdk (cdk-4), atuam promovendo a transição G1-S. O complexo Ciclina-cdk-4 inicia a fosforilação do pRb e é inibido pela CKIS (inibidor da Ciclina-Kinase). No ponto de restrição G1-S, o p53 em resposta ao dano celular, induz a transcrição do gene Waf-1 que por sua vez sintetiza a proteína p21, uma importante inibidora do cdk. O p21 se liga e inativa o complexo Ciclina-cdk, promovendo acúmulo de pRb hipofosforilado que bloqueia o ciclo celular (SHERR e ROBERTS 1999).

Encontramos reduzido número de trabalhos na literatura sobre a expressão da Ciclina D1 em CB quando comparado aos demais marcadores de ciclo celular (TUT et al. 2001).

SHIN et al. (1997) estudaram a expressão da Ciclina D1 em 75 pacientes com CB com o objetivo de avaliar a relação entre a expressão do marcador e o desfecho clínico. A expressão foi analisada por imunoistoquímica e o ponto de corte adotado foi: marcação fraca (+) quando entre 5 e 50% das células estavam coradas e forte (2+) quando mais que 50% das células expressavam Ciclina D1. Na amostra 25,3% (19) apresentaram 1+ de marcação e outros 25,3% apresentaram 2+. A quantidade de CNMI que expressaram Ciclina D1 foi praticamente idêntica a dos CBMI.

Os autores não encontraram significância entre a associação de hiper-expressão de Ciclina D1 e estágio tumoral, grau histológico, sobrevida e recorrência. No entanto aqueles que expressaram 2+ apresentaram recidiva precoce em relação aos que não expressaram ou expressaram fracamente (1+) ($p < 0,01$) (SHIN et al. 1997).

Paradoxalmente, BRINGUIER et al. (1996) encontraram em casuística com 46 pacientes, que os pacientes com tumores com hiperexpressão da Ciclina D1 (>50% das células com expressão) apresentaram evolução clínica menos agressiva que os que não expressavam ou expressavam em menor intensidade.

TUT et al. (2001) estudaram a expressão de Ciclina D1 em CB e correlacionaram com a expressão de p53, ki-67, pRb e waf-1(p21) e avaliaram se a presença de alterações na expressão de Ciclina D1 esteve associado a algum evento prognóstico. Foram avaliados 150 pacientes, sendo 97 com CBNMI (Ta e T1) e 53 com CBMI (T2 a T4). A expressão da

Ciclina D1 foi classificada em ausente (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3). Nesta amostra 52% dos tumores tinham hiperexpressão da Ciclina D1. A expressão de Ciclina D1 foi considerada alterada em 89% dos CBNMI e em 74% dos CBMI. As médias dos valores de Ciclina D1 foram maiores nos CBNMI (41% x 8% no CBMI), assim como a média de Ciclina D1 foi significativamente maior nos tumores de baixo grau (G1 e G2) (43%), comparado aos tumores de alto grau (14%) ($p < 0,005$). Houve correlação positiva entre a expressão de Ciclina D1 e waf1 (p21) ($p < 0,001$) e pRb, porém não houve correlação com o p53. Um achado que chamou a atenção dos autores foi uma maior expressão citoplasmática da Ciclina D1 (ao invés do padrão nuclear) nos CBMI o que pode ser explicado pela inativação da Ciclina D1 ou de sua cdk podendo perder sua localização citoplasmática. Os autores encontraram nesta amostra, que a expressão de Ciclina D1 esteve associada a tumores que não infiltram a camada muscular e a tumores bem diferenciados. A hipótese para explicar esses achados é que os tumores mais agressivos seguem uma via biológica independente da Ciclina D1.

6.4 HER-2 E O CÂNCER DE BEXIGA

HER-2 é um dos membros dos receptores da tirosino-kinase, transmembrana, da família dos receptores de EGF (Epidermal Growth Factor). O HER-2 desempenha um papel fundamental no crescimento, na sobrevivência e migração celular. A ativação anormal de HER-2 foi proposta como estímulo oncogênico (YARDEN 2001). O papel do HER-2 foi mais

estudado no câncer de mama; porém, existem estudos que relacionam sua alteração com outros tipos de cânceres; dentre eles, o CB (LATIF et al. 2003).

A ativação do receptor HER-2 desencadeia a autofosforilação dos resíduos de tirosina-quinase, resultando na ativação de uma cascata de proteínas intracelulares, o que, em tese, aumentaria a atividade mitótica e, conseqüentemente, o potencial de aumentar os índices de metástases. Este achado é particularmente importante para estudos com terapias anti-HER-2 já utilizadas em outras neoplasias, como no câncer de mama (LATIF et al. 2003).

As taxas de superexpressão de HER-2 variam de <10% a >70% dos tumores estudados em séries que demonstraram significância na expressão de HER-2 e eventos prognósticos (BOLENZ e SHARIAT 2010).

O papel da superexpressão do HER-2 no prognóstico do CB permanece incerto. SATO et al. (1992) demonstraram que o HER-2 foi um marcador independente de SCE em portadores de CBMI, enquanto JIMENEZ et al. (2001) não conseguiram demonstrar a relação entre a superexpressão de HER-2 e sobrevida câncer específica.

BOLENZ e SHARIAT (2010) estudaram 198 pacientes submetidos a CR por carcinoma urotelial de bexiga. Desta coorte, 60 pacientes (30,3%) receberam quimioterapia adjuvante, sendo 42 por doença linfonodal positiva, 6 por doença em estágio T4 e 12 por estágio T3.

Os TMAs foram contruídos a partir do tumor e quando havia metástase linfonodal estas também foram avaliadas. Foi usado tecido

mamário normal como controle negativo e amostras de carcinoma ductal como controle positivo.

A análise do TMA foi feita por programa automatizado. O padrão de marcação celular foi:

Positivo - >10% das células tumorais com marcação forte de membrana

Negativo - <10%

Os trabalhos que discutem o papel do HER-2 no CB definem como hiper-expressão números muito variáveis, entre 2% a 74% da membrana marcada. O padrão de marcação foi predominantemente de membrana, sendo que ao menos a fraca marcação esteve presente em todos os casos. Os considerados HER-2 alterados (>10%) foram encontrados em 55 pacientes (27,8%). HER-2 positivo foi significativamente associado à presença de invasão linfovascular, recorrência clínica, tumores com maior estadiamento patológico, pior diferenciação e pior SCE. Na análise multivariada ajustada por achados patológicos, estágio tumoral, grau tumoral, invasão angiolinfática e infiltração tumoral, o HER-2 positivo foi fator de pior prognóstico para SCE e recorrência clínica (BOLENZ e SHARIAT 2010).

7 OBJETIVOS DO TRABALHO

- Avaliar dentro da amostra estudada a imunoexpressão dos marcadores de ciclo celular p53, pRb e Ciclina D1 e o marcador de proliferação HER-2, nos produtos de cistectomia radical por carcinoma urotelial de bexiga;
- Analisar o impacto que a imunoexpressão alterada destes marcadores causa em taxas de sobrevida global, sobrevida câncer específica e na progressão clínica nesta amostra;
- Avaliar as variáveis clínicas e patológicas da coorte e correlacioná-las com a imunoexpressão dos marcadores;
- Correlacionar nossos achados com os da literatura científica.

8 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

8.1 MATERIAL

De uma amostra de 247 CR realizadas no Hospital A.C. Camargo entre o período de janeiro de 2000 e dezembro de 2010, selecionamos 99 pacientes que realizaram CR com linfadenectomia retroperitoneal, por carcinoma urotelial de bexiga. Os critérios para inclusão estão expostos abaixo.

8.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com carcinoma urotelial de bexiga submetidos a CR;
- Presença de amostra tumoral em boas condições para análise e confecção do tissue microarray (TMA);
- Seguimento mínimo de 2 anos;
- Dados em prontuário para preenchimento da ficha de levantamento (Anexo1);
- Presença de amostra de sangue em biobanco;
- Presença de material a fresco disponível para eventuais desdobramentos do trabalho.

8.1.2 Critérios de exclusão

- Material em más condições que impeçam a análise;
- Dados incompletos ou indisponíveis para preenchimento da ficha de levantamento;
- Não realização de linfadenectomia;
- Carcinoma urotelial primário de uretra prostática;
- Outros tipos histológicos que não o carcinoma urotelial.

8.2 CASUÍSTICA

A média da idade dos pacientes da casuística foi de 67 anos, variando de 35 a 87 anos. A mais incidente foi a raça branca, com 65 pacientes (63,7%); a segunda foi a raça amarela, com 6 pacientes (5,88%).

As mulheres representaram 37 (37,3%) dos casos e os homens 62 (62%) dos casos.

O tratamento prévio à cistectomia radical (CR) foi realizado em 42 pacientes (42%), sendo a ressecção endoscópica do tumor de bexiga (RTU-b) realizada em 42 pacientes (42%). Um desses pacientes, além da RTU-b, também foi submetido à cistectomia parcial. Foram encontrados 37 pacientes (37%) portadores de carcinoma não músculo invasivo e 62 (62%) com doença músculo invasiva ao diagnóstico.

Vinte pacientes (20%) foram submetidos a BCG liofilizado intravesical prévio ao tratamento definitivo. Todos os pacientes receberam o ciclo

semanal de indução. Quatorze pacientes (14%) realizaram cistoscopia de controle após o BCG.

Oito pacientes (8%) receberam alguma forma de adjuvância, sendo que, desses, 7 pacientes (7%) foram submetidos a quimioterapia (Qtx); 1 paciente (1%), a radioterapia (Rtx) e 1 paciente (1%), a Qtx e RTx associadas.

Dos pacientes que fizeram tratamento prévio (42), dezenove pacientes (19/42) apresentaram recidiva. Desses, 11(11/42) pacientes recidivaram com doença não músculo invasiva e 8 (7,84%) progrediram para carcinoma músculo invasivo.

A progressão para carcinoma músculo invasivo ocorreu em 20 pacientes (20%) dos 99 estudados.

O escore de ASA (American Society of Anesthesiology) foi: 2 pacientes (2%) com ASA 1, 67 pacientes (67%) com ASA 2, 30 pacientes (30%) com ASA 3.

As indicações de CR estão expostas na Tabela 1. Esses dados são extraídos de prontuário e alguns pacientes apresentavam mais que uma indicação e por este motivo o número total da tabela extrapola o número de casos da amostra.

Tabela 1 - Indicações da cistectomia radical na coorte estudada

Indicação de cistectomia	N	(%)
Progressão para doença músculo invasiva	25	25
Falha do BCG intravesical	6	6
Irressecabilidade a RTU-b	13	13
Múltiplas recidivas prévias	5	5
Carcinoma músculo invasivo ao diagnóstico	55	55

BCG: bacilo Calmette-Guerin; RTU-b: ressecção endoscópica de tumor de bexiga

As variáveis clínicas e anatomopatológicas encontradas na coorte estão expostas na Tabela 2.

Tabela 2 - Estadiamento patológico dos tumores produtos de cistectomia radical (n=99), segundo a classificação AJCC-TNM/ 2009

Variável	Categoria	N	(%)
Estádio patológico	Ta	6	6
	T1	4	4
	T2	11	11
	T3	60	60
	T4	18	18
Estádio linfonodal	N0	63	63
	N1	13	13
	N2	12	12
	N3	11	11
Metástase à distância	M0	88	88
	M1	7	7
	MX	4	4

Nenhum dos casos com doença no estágio pTa no espécime cirúrgico eram inicialmente pTa na RTU-B.

Também categorizamos os casos de acordo com as características histológicas e morfológicas que estão dispostos na Tabela 3.

Merece destaque na casuística as comorbidades apresentadas pelos pacientes. As comorbidades e o tabagismo, seguramente o principal fator de risco para o carcinoma urotelial de bexiga foram estratificados e estão dispostos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 3 - Distribuição das variáveis anatomopatológicas do espécime da CR

Variável	Categoria	N	(%)
Histologia	Urotelial	78	78
	Urotelial com diferenciação escamosa	14	14
	Urotelial com diferenciação glandular	4	4
	Urotelial com diferenciação divergente	7	7
	(plasmocitoide, micropapilífero, sarcomatóide e "nested")		
Grau histopatológico	Alto	95	95
	Baixo	4	4
Multifocalidade	Não	80	80
	Sim	19	19
Carcinoma <i>in situ</i> adjacente	Não	62	60,78
	Sim	37	37
Invasão angiolinfática	Não	59	59
	Sim	40	40
Invasão venosa	Não	80	80
	Sim	19	19

Tabela 4 - Distribuição das doenças associadas dos pacientes portadores de carcinoma urotelial

Doenças associadas	N	(%)
Sem doença clínica	19	18,6
Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	13	12,75
DPOC	9	8,82
Diabetes melitus (DM)	3	2,94
Obesidade	2	1,96
Radioterapia pélvica prévia	1	0,96
Outras	8	7,84
HAS + DPOC	7	6,86
HAS + DM	2	1,96
HAS + obesidade	3	2,94
HAS + outras	14	13,7
DPOC + DM	2	1,96
DPOC + obesidade	3	2,94
DPOC + outras	1	0,98
Obesidade + outras	1	0,98
HAS + DPOC + DM	1	0,98
HAS + DPOC + outras	3	2,94
HAS + DM + outras	3	2,94
DM + obesidade + outras	1	0,98
HAS+ DPOC + DM + obesidade	1	0,98
HAS + DPOC + DM + outras	1	0,98

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

Tabela 5 - Distribuição do tabagismo na casuística

Variável	Categoria	N	(%)
Tabagismo	Não	28	28
	Sim	36	36
	Ex-tabagista	33	33
Número de cigarros por dia	<10 cigarros/dia	6	6
	11-20 cigarros/dia	25	25
	>20 cigarros/dia	31	31
	Ignorado	27	27

8.3 MÉTODO

Foram recuperados as lâminas e os blocos de parafina do arquivo do Departamento de Patologia para a análise imunoistoquímica.

Todas as lâminas foram revisadas por um segundo patologista, especializado em uropatologia. Casos de divergência (12 CR) entre o laudo inicial registrado no prontuário médico e o do patologista revisor, como, por exemplo, avaliação do comprometimento da margem, grau histopatológico do tumor urotelial e estadiamento, foram trazidos a consenso em reunião com um terceiro patologista.

O banco de dados clínicos e anatomopatológicos desses pacientes foi feito por levantamento dos prontuários médicos (SAME) e atualizado a cada consulta de atendimento ambulatorial no Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica, na ficha de anestesia padronizada pelo Departamento de Anestesia e relatório de cirurgia durante a internação dos pacientes. Os dados levantados incluem informações demográficas, antecedentes mórbidos, tipo de tratamento, terapias e diagnósticos prévios, achados dos exames endoscópicos, presença de recorrência/progressão da doença, complicações do tratamento e situação clínica durante e na data final do último seguimento de cada paciente (follow-up). Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento (Anexo 1) padronizada, digitados e arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa *Excel 7.0 for Windows*.

Para fins de definição adotamos como sobrevida global, câncer específica e recidiva clínica os seguintes critérios:

SG: sobrevida global (vivos com ou sem doença versus óbitos por qualquer causa)

SCE: sobrevida câncer-específica (vivos com ou sem doença versus óbito pela doença, excluindo-se os casos de óbito pelo tratamento ou por outras causas)

Progressão clínica: “falha pós-CR” (progressão local ou à distância, após no mínimo 3 meses da data da cirurgia)

8.3.1 Método: construção do TMA e obtenção dos recortes inteiros

Nos casos classificados como invasivos na cistectomia, foram selecionadas as áreas de tumor viável e de urotélio benigno (urotélio normal, distante do tumor e considerado livre de alterações microscópicas) a partir da lâmina de Hematoxilina e Eosina (HE). Estas áreas foram circuladas nos blocos de parafina correspondentes, cujas amostras foram colhidas em quadruplicata para os tumores e em duplicata para os controles benignos. Cada cilindro retirado do bloco doador (1,0 mm de diâmetro) foi introduzido em um novo bloco de parafina (bloco receptor), a partir do qual foram preparados cortes histológicos seriados com espessura de 4 μ m, em lâminas de vidro previamente tratadas com película aderente especial (silanizadas). Os casos foram distribuídos em 2 blocos de Tissue MicroArray (TMA), que incluem, além das amostras de interesse, tecidos variados, malignos e benignos, de outros órgãos, que não apenas operam como

controles externos positivos e negativos para cada marcador incluído no estudo, mas também orientam a leitura das lâminas. Para o controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por HE a cada 25 níveis. Nos demais casos considerados não músculo invasivos (pTis/pTa/pT1), foram selecionados blocos representativos do tumor e do urotélio benigno, representados em cortes inteiros na lâmina.

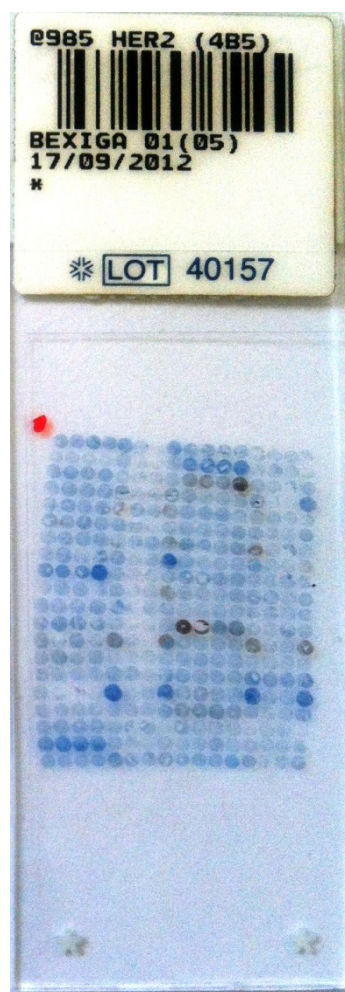
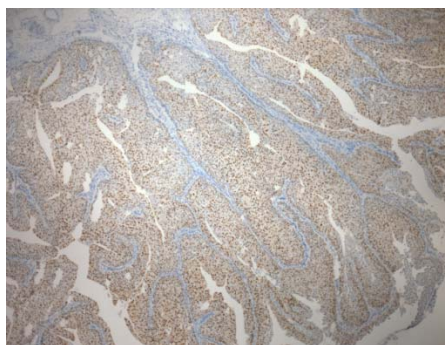


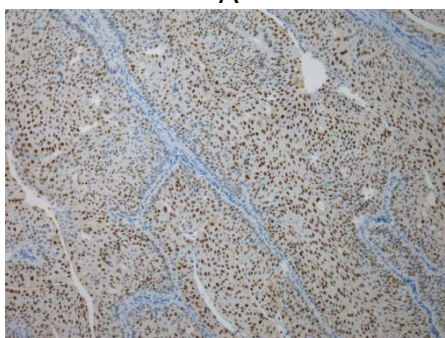
Figura 4 - *Scanner* de uma das lâminas de TMA corada em H&E: os tumores músculo invasivos (pT2+) foram incluídos no TMA de 1,0 mm, em quadruplicata, acompanhados dos controles (urotélio benigno do mesmo paciente).



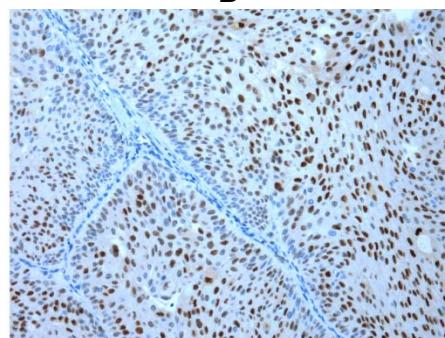
Figura 5 - *Scanner* de uma das lâminas de corte inteiro corada em H&E: os tumores não músculo invasivos (pTis/pTa/pT1) foram mantidos em cortes inteiros, acompanhados de um fragmento controle (urotélíio benigno do mesmo paciente), neste caso, uma margem ureteral



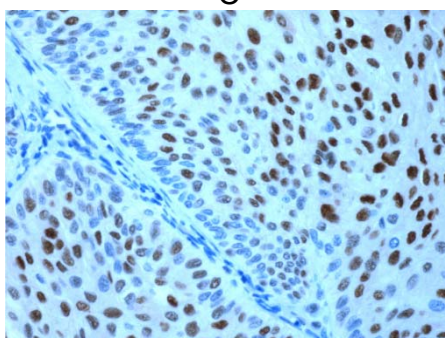
A



B

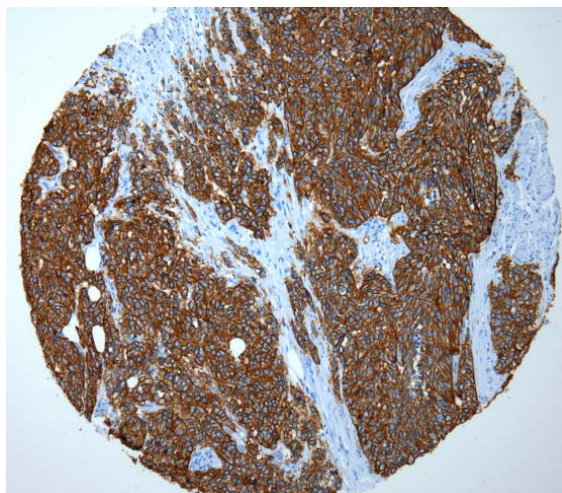


C

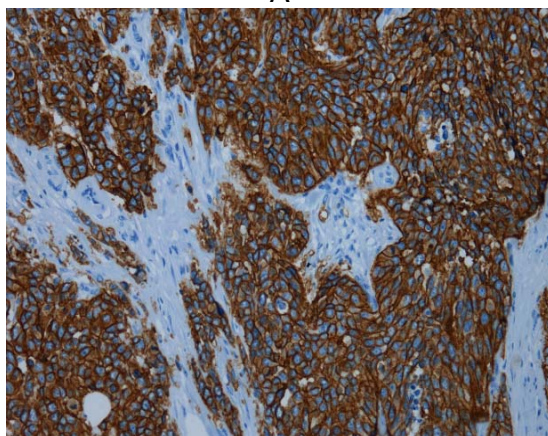


D

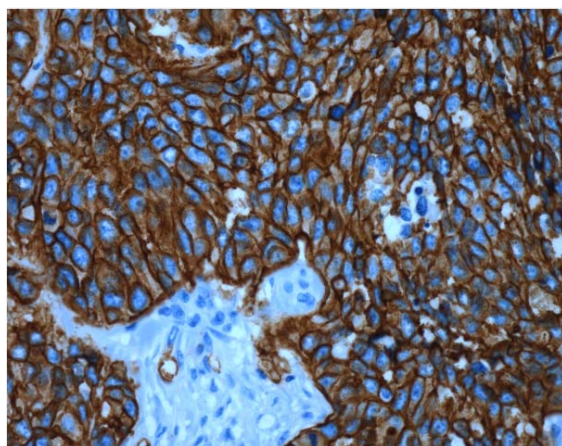
Figura 6 - Fotomicrografia: imunoexpressão de Ciclina D1 em padrão nuclear, forte e difuso (escore 4). A-4x; B-10x; C-20x; D-40x.



A



B



C

Figura 7 - Fotomicrografia: imunoexpressão de HER-2, em padrão membranoso, completo, forte intensidade, em mais de 30% das células neoplásicas (escore 3). A-10x; B-20x; C-40x.

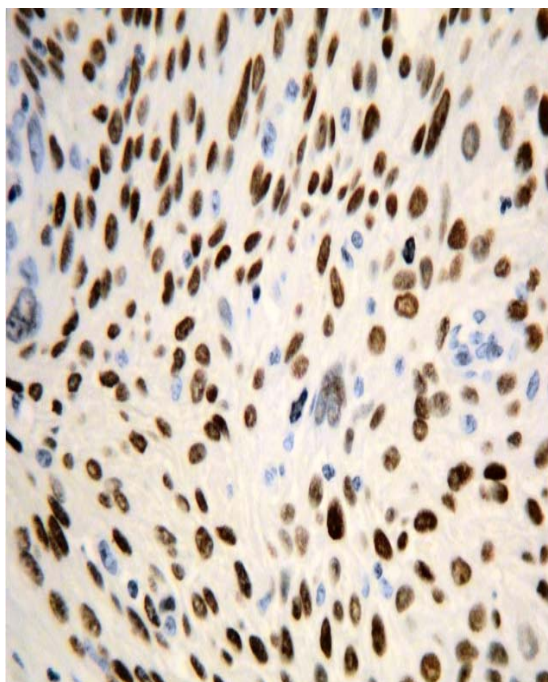


Figura 8 - Fotomicrografia: imunoexpressão de p53, em padrão nuclear, forte e difuso (escore 4)

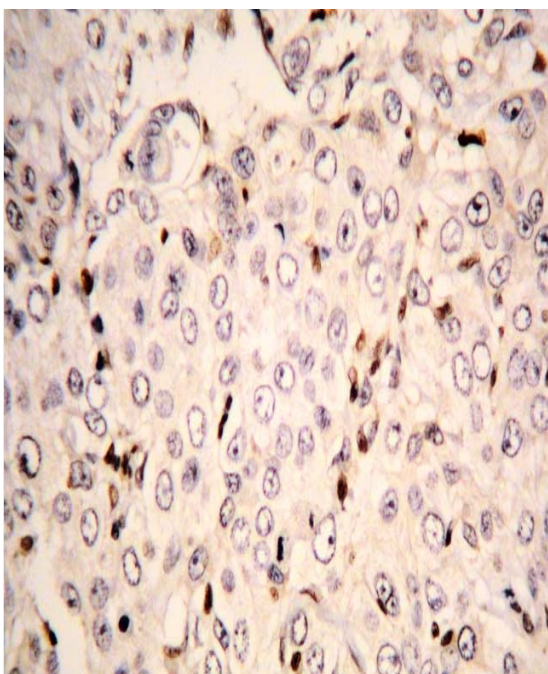


Figura 9 - Fotomicrografia, 40x. imunoexpressão negativa de pRb (escore 0). Controle interno positivo em fibroblastos

8.3.2 Método: Avaliação da expressão das proteínas p53, pRb, HER-2 e Ciclina D1 por imunoistoquímica

Recortes de TMA (cistectomias pT2+) e dos blocos inteiros (cistectomias pTis/pTa/pT1), acompanhados de urotélio benigno correspondente para cada caso (controle normal) foram desparafinizados e reidratados. Para os anticorpos p53, pRb, HER-2 e Ciclina D1, as reações foram conduzidas conforme o protocolo exposto no Quadro 5.

Quadro 5 - Padronização dos anticorpos submetidos à imunoistoquímica

	Marca/Clone	Pré-tratamento	Diluição	Incubação	Deteção	Sistema
p53	Ventana DO-7	CC1 30 min (pH alto)	pronto para uso	32 min	UltraView	automação
pRb	Novocastra 13A10	CC1 30 min (pH alto)	1:100	32 min	Polímero	manual
HER-2	Ventana 4B5	CC1 30 min (pH alto)	pronto para uso	12 min	UltraView	automação
Ciclina D1	Ventana DO-7	CC1 30 min (pH alto)	pronto para uso	32 min	UltraView	automação

Os marcadores foram analisados no microscópio ótico. Uma vez que, para os marcadores pRb, p53 e Ciclina D1 e HER-2 a intensidade da expressão foi homogênea (moderada a intensa, quando positivo) e foi anotada apenas a porcentagem de células positivas de acordo com o padrão de expressão estabelecido para cada anticorpo (citoplasmático e/ou nuclear), estabelecendo-se categorias arbitrárias:

Escore 0: 0-5%;

Escore 1: 6-25%;

Escore 2: 26-50%;

Escore 3: 51-75%;

Escore 4: 76-100%.

Cada corte inteiro recebeu um escore único, a partir da observação de no mínimo 5 campos de maior aumento (CMA) e o escore final das amostras quadruplicadas no TMA foi a média aritmética dos escores obtidos em cada representação.

8.3.3 Critérios para obtenção dos pontos de corte considerados positivos, para os marcadores estudados.

Adotamos como ponto de corte considerado como p53 alterado, a presença de 25% dos núcleos expressos a imunoistoquímica (escores 2, 3 e 4). Não há consenso na literatura sobre os valores adotados, no entanto a maioria dos trabalhos publicados considera como p53 hiper-expresso quando 10-20% dos núcleos estão expressos à imunoistoquímica (SMITH et al. 2003).

Seguimos além dos achados da literatura, o controle interno (amostras de tecido benigno) para definir o ponto de corte a partir do qual seria considerado como p53 mutado.

Encontramos no grupo controle (amostras de tecido benigno) 9 pacientes (10,84%) que tiveram escore 1, ou seja praticamente 11% do

urotélío normal expressa p53 até 25%, e em nenhum dos controle o p53 esteve expresso acima do escore 2 ,lembrando que a análise dos controles foi feita em duplicata e esses valores correspondem a média dos escores encontrados. Outra razão para adotarmos essa média de corte foi a distribuição positiva do p53 conforme os estádios patológicos estratificados e agrupados, onde no estágio pTa+pTis, pT1, pT2 e pT3+T4, foi 10,26%, 7,69%, 23,08% e 58,97%, respectivamente. Estes resultados não estão associados com significância estatística para associação com estágio ($p=0,351$), entretanto, estes percentuais por estádios patológicos estão de acordo com valores considerados positivos para percentual de positividade em estudos da literatura (SMITH et al. 2003).

Na Tabela 6 estão expostos os níveis de expressão dos marcadores nas amostras de tumores e no urotélío benigno.

Tabela 6 - Frequência dos marcadores imunoistoquímicos por escores no tumor e no urotélio normal (controle interno)

Escore no tumor	N	(%)	Escore no urotélio	N	(%)
p53			p53		
0	30	30,30	0	74	89,16
1	30	30,30	1	9	10,84
2	12	12,12			
3+4	1+26	27,27			
Ciclina D1			Ciclina D1		
0	28	28,28	0	30	37,97
1	24	24,24	1	35	44,30
2	23	23,23	2	13	16,46
3	15	15,15	3	1	1,27
4	9	9,09			
pRb			pRb		
0	21	21,21	3	3	3,66
2+3	1+7	8,08	4	79	96,34
4	70	70,71			
HER-2			HER-2		
0	64	64,65	0	54	72,00
1	17	17,17	1	20	26,67
2	12	12,12	2	1	1,33
3	6	6,06			

Escore 0: 0-5%, escore 1: 6-25%, escore 2: 26-50%, escore 3: 51-75%, escore 4: 76-100%

Os demais marcadores também foram analisados a partir dos controles internos, ou seja, da positividade do escore no urotélio normal que serviu como controle individual para cada caso, além de a decisão para adotar os cortes, foi que os valores do escore no tumor estivessem acima da mediana no escore no urotélio normal, exceção feita ao pRb que foi considerado anormal a ausência do marcador ou seja, escore 0. As medianas nos tumores e no urotélio benigno estão descritos na Tabela 7.

Consideramos a Ciclina D1 como positivo quando a expressão foi maior que 50% das células expressas. Encontramos nos controle cerca de 65% das células com ausência de expressão ou com expressão até 25%. A mediana do escore da Ciclina D1 no controle foi 0,74 (DP 0,78), assim consideramos como positivo a Ciclina D1 expressa acima do escore 3, corroborando achados da literatura (SHIN et al. 1997).

Consideramos HER-2 positivo quando mais do que 10% das células expressaram o marcador. Estes valores estão de acordo com os descritos na literatura e nos controle benignos que em 54% dos casos não expressaram HER-2 (escore 0), e não houve nenhum caso dos controles com expressão acima do escore 3. A mediana no urotélio benigno foi 0 (DP 0,48), logo adotamos como ponto de corte o escore 1, validado em nossa amostra e de acordo com a literatura (BOLENZ e SHARIAT et al. 2010).

Consideramos o pRb como positivo somente quando houve ausência total de marcação (escore 0) baseado além de dados da literatura nos nossos controle internos onde nenhum caso do controle teve expressão 0, 1 ou 2. Em nossa amostra praticamente 80% do urotélio benigno esteve marcado com pRb no escore 4 e portanto não adotamos este valor como positivo, embora alguns trabalhos também considerem o pRb com nível de expressão muito elevado como uma forma inativa do pRb (COTE et al. 1998).

Tabela 7 - Média, desvio-padrão, mediana e variação dos escores de marcadores imunoistoquímicos no tumor e no urotélio normal

Marcador	Média dos escores	Desvio padrão	Mediana	Variação
p53 no tumor	1,54	1,55	1	0-4
p53 no urotélio	0,09	0,28	0	0-1
Ciclina D1 no tumor	1,37	1,25	1	0-4
Ciclina D1 no urotélio	0,74	0,72	1	0-3
pRb no tumor	3,03	1,62	2,75	0-4
pRb no urotélio	3,84	0,50	4	1-4
HER-2 no tumor	0,54	0,88	0	0-3
HER-2 no urotélio	0,33	0,48	0	0-2

Após as análises feitas, encontramos os pontos de cortes para cada marcador a ser estudado. Estes valores estão expostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores dos escores da expressão dos marcadores imunoistoquímicos (citoplasmático e/ou nuclear) considerados alterados nos tumores

Marcador	Escore ou porcentagem de positividade	N	(%)
p53	2-4 ou 26-100%	39	39,39
Ciclina D1	3-4 ou 51-100%	17	17,17
pRb	0 ou 0-5%	21	21,21
HER-2	1-4 ou 5-100%	35	35,35

8.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos prontuários foram registrados em uma ficha de levantamento padronizada (Anexo 1), digitados e arquivados em um banco de dados com o auxílio do programa *Excel 7.0 for Windows*. Para a análise

estatística, utilizou-se o software *Windows Statistical Package for Social Science* (SPSS), versão 17.0.

A distribuição das variáveis clínicas e anatomopatológicas referentes ao tratamento foi apresentada na forma de tabelas de contingência. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e seus respectivos desvios-padrão.

Com o intuito de se verificar a existência de associação das variáveis às demais variáveis, foi realizado o teste Qui-Quadrado de Pearson (BUSSAB e MORETTIN 2002). Para os casos em que as frequências esperadas foram inferiores a 5, foi utilizado o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi o de 5%.

A identificação dos fatores independentes relacionados à SG, SCE e SLD foi realizada pela regressão logística múltipla. As variáveis selecionadas para o estudo múltiplo foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20. O resultado final para os modelos multivariados, para a regressão logística e de COX (1972) foi obtido pela estratégia *stepwise forward selection*, pela qual, a partir da variável de maior significância na análise univariada, foram acrescentadas às outras, uma a uma, em ordem crescente.

Para estudar as análises de SG, SCE e SLD, utilizou-se o estimador de Kaplan e Meier (1958) como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com CB estar vivo ou de não apresentar recidiva até o instante de tempo considerado. Através da representação gráfica desse estimador,

conseguimos visualizar, para uma determinada variável, qual categoria de pacientes apresenta maior probabilidade de não morrer por CB ou não apresentar recidiva de CB ao longo do tempo. Quanto mais elevada for a curva referente a uma determinada categoria, maior será a probabilidade de os pacientes dessa categoria estarem vivos ou sem recidiva do CB até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas estimadas para cada categoria dentro de uma determinada variável, utilizou-se o teste não-paramétrico de LogRank.

Pacientes considerados perdidos de seguimento na data da última informação contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

Os valores referentes aos dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas com eliminação de casas decimais. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

9 RESULTADOS

9.1 RESULTADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

Para melhor analisarmos os resultados encontrados subdividimos os achados em clínico-patológicos e associados aos marcadores.

A comorbidade agrupada, distribuída em: nenhuma, uma, duas, três e quatro doenças associadas estiveram associadas com as faixas etárias: menor de 60, 61-70 e maior de 70 anos, respectivamente ($p=0,015$). Da mesma forma, a comorbidade agrupada esteve associada à classificação de ASA ($p=0,004$).

O tempo de internação variou de 5 a 89 dias, com média de tempo de internação de 20,36 dias. O tempo de internação menor do que 10, de 11-20 e de 21-89 dias ocorreu em 26 (25,24%), 46 (44,66%) e 31 (30,10%) pacientes, respectivamente. O tempo de internação estratificado em tercís não esteve relacionado com as comorbidades agrupadas dos pacientes ($p=0,369$), mas esteve muito associado à transfusão intraoperatória ($p=0,009$), assim como ao volume de sangue transfundido ($p=0,029$).

A transfusão intraoperatória foi realizada em 77 pacientes (75,49%). Vinte pacientes (19,61%) não foram transfundidos e 5 pacientes (4,9%) não apresentavam dados referentes à transfusão. O volume de hemoderivados recebidos variou de 300 a 2100 ml, com média de 663 ml.

As complicações médicas estiveram relacionadas com o tempo de internação ($p<0,001$); assim, 24 de 102 pacientes (23,53%) foram reoperados por complicações relacionadas a CR no pós-operatório imediato (até 30 dias) ($p<0,001$). As complicações tardias desenvolvidas pelos pacientes e decorrentes da cirurgia não estiveram relacionadas com o tempo de internação do paciente ($p=0,551$).

A reconstrução do trato urinário após a CR mais utilizada foi o conduto ileal (ureteroileostomia cutânea ou cirurgia de Bricker), em 71 pacientes (71,7%), e a reconstrução continente (neobexiga ortotópica) foi realizada em 31 pacientes (30,3%). A média do tempo de internação dos pacientes submetidos à cirurgia de Bricker foi de 21,02 dias e dos pacientes a CR com neobexiga ortotópica foi de 18,25 dias ($p=0,4110$).

A média do tempo de seguimento global dos 19 pacientes portadores de tumor não músculo invasivo foi de 48,53 meses e a dos 78 pacientes portadores de tumor músculo invasivo foi de 25,77 meses ($p=0,0035$).

A progressão clínica estratificada por estágio patológico está expressa na Tabela 9.

Tabela 9 - Progressão clínica por estágio patológico e tempo para progressão. Valor de p para progressão clínica e tempo para progressão clínica (PC)

Estádio patológico	Progressão clínica (N e %) p=0,04	Tempo para PC (meses) p=0,036
pTa	(1/6) - 20%	34,61
pTis	(3/4) - 75%	43,63
pT1	0%	-
pT2	(4/11) - 34,78%	17,4
pT3	(31/60) - 51%	10,53
pT4	(9/18) - 50%	7,43

Frisamos que todos esses tumores são encontrados na peça de cistectomia. Dos 4 pacientes classificados como Tis na peça, 3 eram T2 no produto da RTU.

A progressão clínica do câncer ocorreu em 2 de 10 pacientes (20%) portadores de tumor não músculo invasivo e ocorreu em 41 de 89 pacientes (46,15%) portadores de carcinoma músculo invasivo (p=0,063). A média do tempo livre para a progressão clínica da doença nos pacientes portadores de tumor não músculo invasivo foi de 45,39 meses e, nos pacientes portadores de tumor músculo invasivo, foi de 22,02 meses (p=0,0032).

A sobrevida câncer-específica em 5 anos foi de 59,67 anos e, em 10 anos, de 55,55 meses, nos pacientes que tiveram maior tempo de seguimento. No seguimento final, os resultados estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Situação clínica final dos pacientes

Situação clínica	N (%)
Vivos assintomáticos	37 (38,14)
Vivos com recidiva	4 (4,12)
Óbitos por progressão	33 (34,02)
Óbitos por complicações cirúrgicas	12(12,37)
Óbitos por outras causas	5 (11)
Sobrevida	
Global (%)	57,3
Câncer específica (%)	44,6
Média do tempo de seguimento (meses)	31,3
Média do tempo livre de recorrência	17,12

O tabagismo e o ex-tabagismo foram fatores adversos de sobrevida global e câncer-específica. O estadiamento patológico, a invasão venosa e a densidade nodal foram preditores dos parâmetros de sobrevida. Exceto por invasão venosa, os demais parâmetros patológicos foram preditores de progressão.

Na Tabela 11 descrevemos em análise univariada os desfechos clínicos, patológicos e de imunoexpressão.

Tabela 11 - Análise univariada dos parâmetros clínicos, patológicos e de imunoexpressão dos marcadores conforme sobrevida global, SCE e progressão clínica

Variável	Sobrevida global	SCE	Progressão clínica
Sexo	NS	0,08	NS
Número de comorbidades	0,08	NS	NS
Hipertensão arterial sistêmica	0,004	0,079	NS
Tabagistas e ex-tabagistas	0,05	0,024	NS
Estádio patológico T	0,032	0,011	0,034 (não-OC)
Histologia	NS	NS	0,035
Invasão venosa	0,024	0,028	0,069
Densidade linfonodal (20%)	0,005	0,002	0,01

Todos os pacientes com carcinoma urotelial com diferenciação e variante histológica eram portadores de tumores invasivos ($p < 0,001$), mostrando que a diferenciação determina maior agressividade do que os tumores uroteliais puros.

Os carcinomas uroteliais com diferenciação eram órgãos confinados em 4 pacientes (16%) e do estágio pT2 e não órgão confinado em 21 pacientes (84%), pT3-pT4, $p = 0,001$. A progressão clínica pós-CR no carcinoma urotelial puro ocorreu em 26/74 pacientes (35,14%) e no carcinoma urotelial com diferenciação em 14/25 (56%), $p = 0,066$. Entretanto quando se avaliou a evolução dos pacientes na curva de Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica não mostrou diferença significativa quando ao tempo para progressão clínica, conforme exposto na Figura 10.

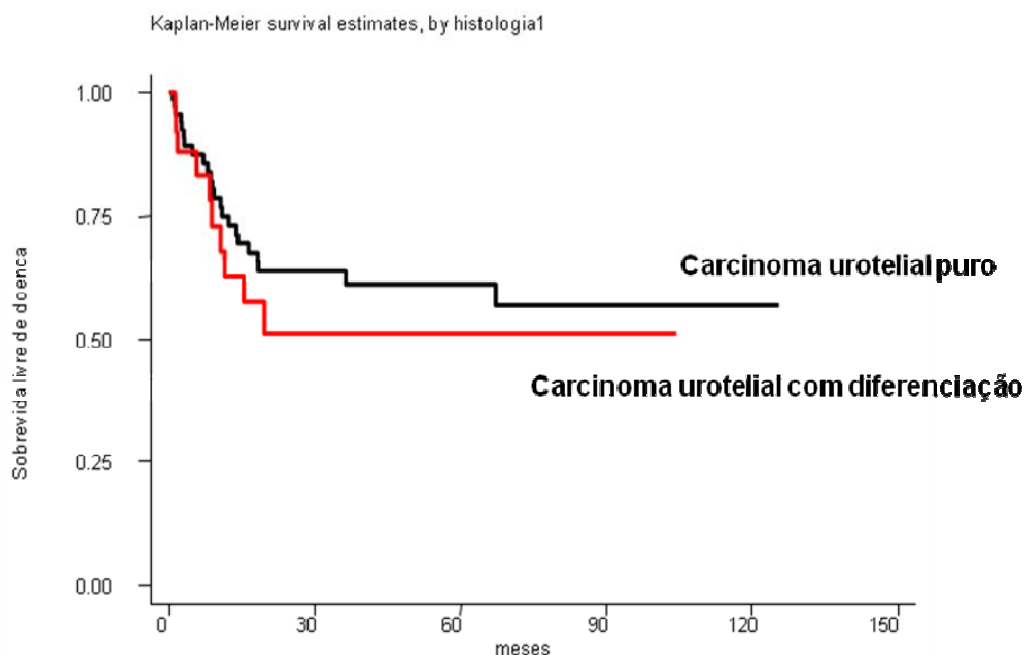


Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por tipo histológico: carcinoma urotelial puro (N=74) e carcinoma urotelial com diferenciação (N=25), (p=0,4391)

O tumor primário na apresentação foi considerado não músculo invasivo em 37 pacientes (38,14%) e em 59 pacientes foi invasivo (61,86%). Não houve associação significativa com o tipo histológico urotelial puro (74,49%) e urotelial com diferenciação escamosa, com diferenciação glandular ou com diferenciação divergente (p=0,256).

Os 59 tumores primários músculo invasivos (61,86%) na sua apresentação inicial eram órgãos confinados (pTa-pT2) em 19 pacientes (32,76%) e não órgãos confinados (pT3-pT4) em 40 pacientes (67,24%) no espécime da CR, p=0,021.

Das variáveis clínicas e patológicas, em análise univariada, apresentaram significância o estadiamento patológico, as margens positivas

e a invasão angiolinfática, conforme descrito na Tabela 12.

Vale frisar que quando estudamos as margens, consideramos como margem positiva a presença de tumor no tecido adiposo peri-vesical. O termo margem tubular faz menção a extensão tumoral pelas margens uretral e ureterais, no entanto sem extrapolar os limites do órgão.

Quando colocamos as variáveis em análise multivariada, encontramos que foram significativos somente o estágio patológico, e as margens. Os linfonodos não foram fator adverso na análise multivariada.

Tabela 12 - Análise univariada de risco de Cox para prever a sobrevida câncer-específica

Variável	OR	P	(95% IC)
Tumor não músculo invasivo	1,00 (Ref.)		
Tumor músculo invasivo	1,76	0,019	1,09-2,85
Margem negativa	1,00 (Ref.)		
Margem positiva	3,50	0,001	1,63-7,53
Margem tubular	0,75	0,782	0,10-5,60
Invasão vascular negativa	1,00 (Ref.)		
Invasão vascular positiva	2,53	0,016	1,18-5,40
LND negativo	1,00 (Ref.)		
1 LND positivo	1,08	0,890	0,36-3,21
2 LND positivos	2,75	<0,001	1,07-7,04
≥3 LND positivos	3,40	0,011	1,32-8,74

OR = odds ratio; Ref.= Referência; CI = intervalo de confiança; LND: linfonodo

Tabela 13 - Análise multivariada de risco de Cox para prever a sobrevida câncer-específica

Variável	OR	P	(95% IC)
Margem negativa	1,00 (Ref.)		
Margem positiva	1,20	0,002	0,44-1,97
Tumor não músculo invasivo	1,00 (Ref.)		
Tumor músculo invasivo	1,65	0,024	0,21-3,09

OR = odds ratio; Ref.= Referência; CI = intervalo de confiança

Nas figuras que seguem estão expostas a curva de Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica na coorte global (Figura 11), categorizado por estadiamento pT (Figura 12) e pelo status linfonodal (Figura 13).

Quando analisamos o status linfonodal encontramos curvas de sobrevida dos pacientes com estágio pN0 praticamente sobrepostas aos pN1 de modo que para análise de sobrevida agrupamos os estádios pN0 e pN1 (Figura 14).

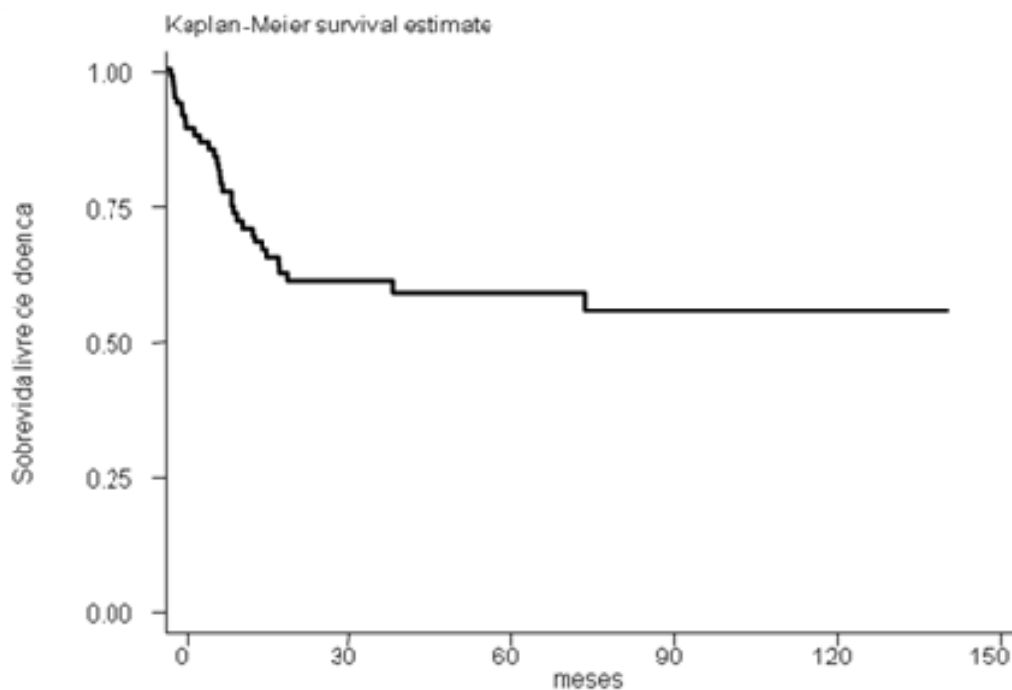


Figura 11 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer-específica

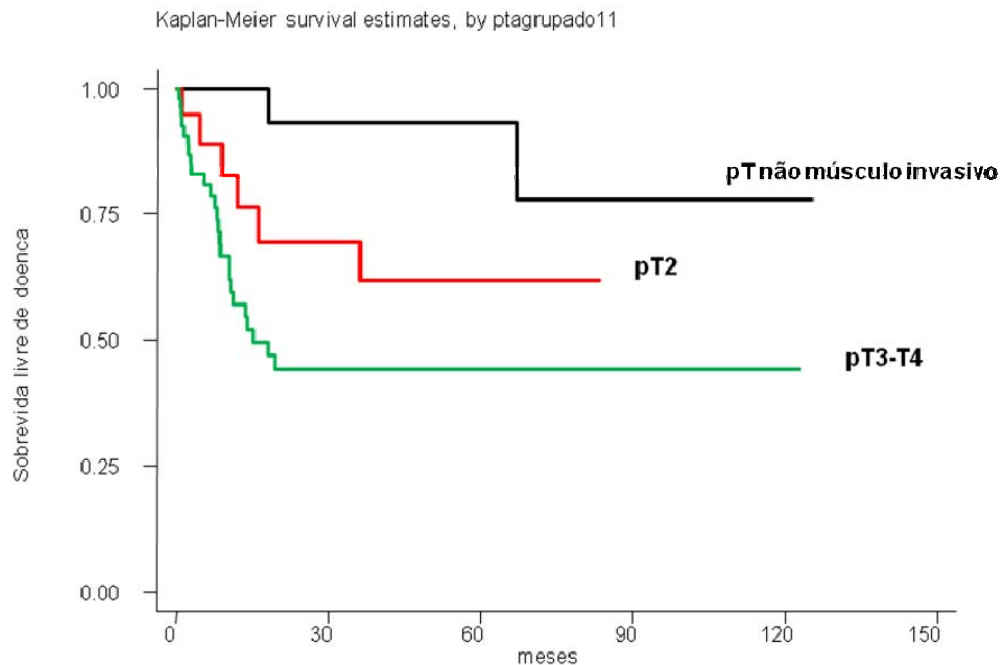


Figura 12 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por pT agrupado (pTa+pTis+pT1, N=19), (pT2, N=23) e (pT3 e pT4, N=55), $p=0,0074$

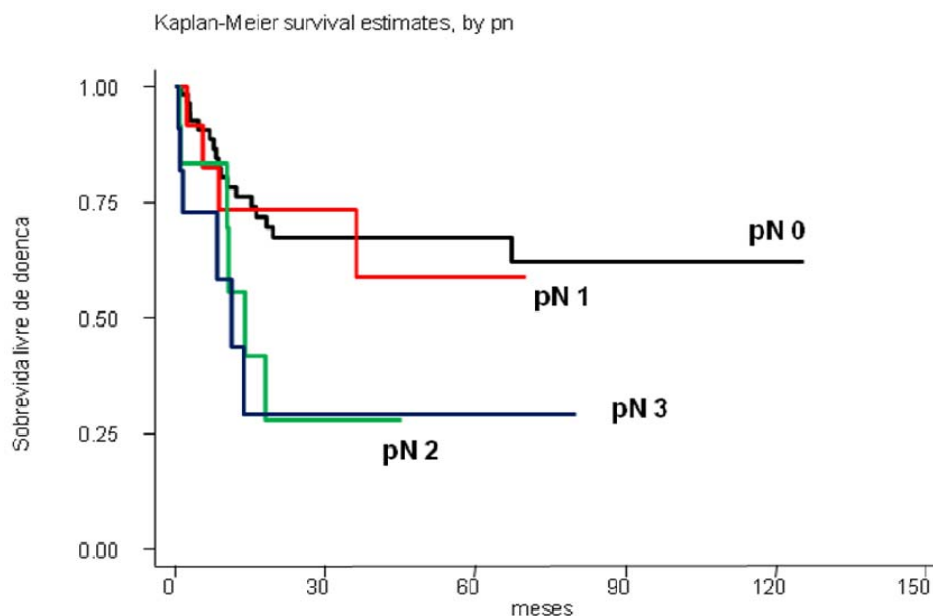


Figura 13 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por pN0 (N=62), pN1 (N=13), pN2 (N=12) e pN3 (N=11), $p=0,0179$

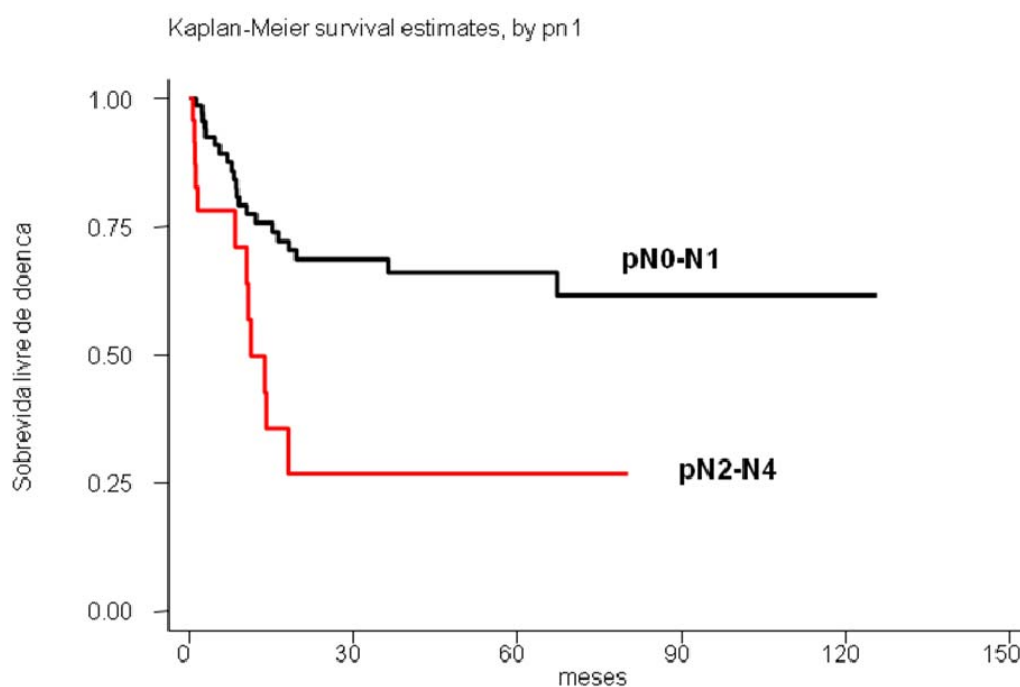


Figura 14 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por pN agrupado (N0+N1, N=75) e (N2+N3, N=23), $p=0,0018$

9.2 RESULTADOS RELACIONADOS AOS MARCADORES

A média do escore pRb, p53, HER-2 e Ciclina D1 foram 3,03 (DP1,62), 1,53 (DP 1,55), 0,54 (DP 0,88) e 1,37 (DP 1,25) no grupo dos tumores malignos, respectivamente, e de 3,84 (DP 0,50), 0,09 (DP 0,28), 0,33 (DP0,48) e 0,74 (DP 0,72) no grupo controle, respectivamente.

Não se observou associação da positividade dos marcadores listados com a expressão dos mesmos no controle interno (amostras de urotélio benigno): p53($p=0,286$), Rb ($p=0,545$) e com o HER-2 ($p=0,305$). Diferentemente da Ciclina D1 que apresentou associação entre a hiperexpressão no tecido tumoral e o controle interno ($p=0,037$), ou seja não houve diferença entre a expressão da Ciclina no tumor e no urotélio benigno.

Quando analisamos a correlação entre o p53 positivo e os demais marcadores também positivos encontramos associação positiva e com significância ($p=0,003$) somente com o pRb e quando consideramos a ausência total de expressão no tumor (escore 0). Nota-se que cerca de 80% dos tumores com ausência de expressão do pRb encontram-se com p53 hiper-expresso ,escores 3 e 4 ($p=0,003$). Quanto a Ciclina D1, encontramos que 46,4% dos tumores com ausência de expressão da Ciclina apresentaram p53 nos escores 3 e 4 ($p=0,06$) e esses valores diminuem progressivamente à medida que aumentamos o escore de expressão da Ciclina D1.

Quando analisamos a associação entre os outros marcadores, encontramos que a perda de expressão de pRb se associou com a ausência

de expressão de Ciclina D1 ($p=0,019$), mas não com a hiperexpressão do escore do marcador HER-2 ($p=0,464$) que por sua vez também não mostrou relação com a hiper-expressão da Ciclina D1 ($p=0,581$).

Ao compararmos a expressão do HER-2 com o p53 encontramos que daqueles que hiperexpressavam o HER-2 no escore 3,85% encontravam-se com p53 nos escores 3 e 4, ainda que este achado não tenha apresentado significância ($p=0,15$).

Os dados da relação entre os marcadores estão expostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Associação da expressão imunoistoquímica p53 estratificado e agrupado (3+4) por escores dos marcadores moleculares estratificados entre si

Marcador	Escore p53 em porcentagem				Total	P
Ciclina D1	0: 0-5	1: 6-25	2: 26-50	4: 51-100		
0	10 (35,71)	3 (10,71)	2 (7,14)	13 (46,43)	28	0,067
1	7 (29,17)	7 (29,17)	2 (8,33)	8 (33,33)	24	
2	7 (30,43)	7 (30,43)	5 (21,74)	4 (17,39)	23	
3	3 (20,00)	8 (53,33)	2 (13,33)	2 (13,33)	15	
4	3 (33,33)	5 (55,56)	1 (11,11)	0	9	
Total	30 (30,30)	30 (30,30)	12 (12,12)	27 (27,27)	99	
pRb						0,003
0	4 (19,05)	3 (14,29)	2 (9,52)	12 (57,14)	21	
1+2+3	6 (75,00)	2 (25,00)	-	-	8	
4	20 (28,57)	25 (35,71)	10 (14,29)	15 (21,43)	70	
Total	30 (30,30)	30 (30,30)	12 (12,12)	27 (27,27)	99	
HER-2						0,153
0	23 (35,94)	20 (31,25)	8 (12,50)	13 (20,31)	64	
1	4 (23,53)	6 (35,29)	2 (11,76)	5 (29,41)	17	
2	2 (16,67)	4 (33,33)	2 (16,67)	4 (33,33)	12	
3	1 (16,67)	-	-	5 (83,33)	6	
Total	30 (30,30)	30 (30,30)	12 (12,12)	27 (27,27)	99	

Escore 0: 0-5%, escore 1: 6-25%, escore 2: 26-50%, escore 3: 51-75%, escore 4: 76-100%

Uma vez estudado a relação entre os marcadores, analisamos a expressão destes marcadores de acordo com o estadiamento patológico.

Quando estratificamos os casos em tumores que estavam restritos a mucosa (pTa e pTis), CBNMI (pT1), pT2 e doença não órgão confinada, não encontramos correlação entre o estadiamento patológico e o escore dos marcadores p53, pRb e HER-2 em qualquer nível de expressão. Aqueles que não expressavam Ciclina D1 ou os que expressavam fracamente, escore 0 e 1, apresentavam-se em 75% e 66% respectivamente, em estágio patológico pT3 e pT4 ($p < 0,002$) como demonstra os dados da Tabela 15.

No entanto, quando analisamos somente os marcadores positivos, encontramos que os casos onde a Ciclina D1 esteve hiper-expressa (escore 3 e 4) estiveram associados a tumores de baixo estágio patológico, cerca de 52% dos pacientes com Ciclina D1 com escores 3 e 4 estão categorizados como CBNMI ($p < 0,001$). Diferentemente da Ciclina, 80% dos casos onde não havia expressão do pRb (escore 0) estavam categorizados no grupo dos tumores não órgão confinados ($p = 0,047$).

Os demais marcadores não demonstraram estar associados com significância com o estágio patológico.

Analisamos também o número de marcadores hiper-expressos e seu papel no estadiamento patológico, e não encontramos correlação entre o número de marcadores positivos e o estadiamento, no entanto notamos que há um aumento progressivo nos estadiamentos patológicos conforme aumentamos o número de marcadores positivos, ainda que sem apresentar significância estatística, conforme expresso na Tabela 16.

Tabela 15 - Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímicos avaliados no espécime da CR nos tumores não músculo invasivos pTa e pTis agrupados e pT1 e dos tumores músculo invasivos do estágio pT2 e dos estádios pT3 e pT4 agrupados

Marcador escore no tumor	Estádio patológico				N	P
	pTa+pTis	T1	T2	T3+T4		
p53						0,419
0	1 (3,33)	3 (10,00)	9 (30,00)	17 (56,67)	40	
1	6 (20,00)	3 (10,00)	6 (20,00)	15 (50,00)	30	
2+3	3 (25,00)	1 (8,33)	3 (25,00)	5 (41,67)	12	
4	1 (3,70)	2 (7,41)	6 (22,22)	18 (66,67)	27	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
Ciclina D1						0,002
0	1 (3,57)	1 (3,57)	5 (17,86)	21 (75,00)	28	
1	1 (4,17)	1 (4,17)	6 (25,00)	16 (66,67)	24	
2	6 (26,09)	1 (4,35)	5 (21,74)	11 (47,83)	23	
3	1 (6,67)	5 (33,33)	3 (20,00)	6 (40,00)	15	
4	2 (22,22)	1 (11,11)	5 (55,56)	1 (11,11)	9	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
pRb						0,089
0	2 (9,52)	-	2 (9,52)	17 (80,95)	21	
2+3	-	1 (12,50)	4 (50,00)	3 (37,50)	8	
4	9 (12,86)	8 (11,43)	18 (25,71)	35 (50,00)	70	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
HER-2						0,230
0	4 (6,25)	5 (7,81)	14 (21,88)	41 (64,06)	64	
1	5 (29,41)	2 (11,76)	4 (23,53)	6 (35,29)	17	
2	1 (8,33)	1 (8,33)	5 (41,67)	5 (41,67)	12	
3	1 (16,67)	1 (16,67)	1 (16,67)	3 (50,00)	6	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	

Escore 0: 0-5%, escore 1: 6-25%, escore 2: 26-50%, escore 3: 51-75%, escore 4: 76-100%

Tabela 16 - Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR nos tumores não músculo invasivos Ta e Tis agrupados e T1 e dos tumores músculo invasivos do estágio T2 e dos estádios T3 e T4 agrupados

Escore agrupado	Estádio patológico				N	P
	pTa+pTis	T1	T2	T3+T4		
p53						0,950
0-1	7 (11,67)	6 (10,00)	15 (25,00)	32 (53,33)	60	
2-4	4 (10,26)	3 (7,69)	9 (23,08)	23 (58,97)	39	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
Ciclina D1						<0,001
0-2	8 (9,76)	3 (3,66)	19 (23,17)	52 (63,41)	82	
3-4	3 (17,65)	6 (35,29)	5 (29,04)	3 (17,65)	17	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
pRb						0,047
0	2 (11,54)	-	2 (9,52)	17 (80,95)	21	
1-4	9 (11,54)	9 (11,54)	22 (28,21)	38 (48,72)	78	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
HER-2						0,073
0	4 (6,25)	5 (7,81)	14 (21,88)	41 (66,06)	64	
1-3	7 (20,00)	4 (11,43)	10 (28,57)	14 (40,00)	35	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	
Marcadores positivos agrupados						0,143
0	2 (8,70)	-	4 (17,39)	17 (73,91)	23	
1	3 (8,11)	4 (10,81)	13 (35,14)	17 (45,95)	37	
2	3 (11,11)	5 (18,52)	5 (18,52)	14 (51,85)	27	
3-4	3 (25,00)	-	2 (16,67)	7 (58,33)	12	
Total	11 (11,11)	9 (9,09)	24 (24,24)	55 (55,56)	99	

Quando subdividimos o tipo histológico em carcinoma urotelial puro e em carcinoma urotelial com suas variantes, os marcadores categorizados pelos escores não mostraram associação significativa ($p>0,05$) com os subtipos, assim como com os marcadores positivos agrupados ($p=0,458$).

Cerca de 80% dos tumores que expressavam p53 nos escores 3 e 4 foram classificados como carcinoma urotelial puro, assim como o HER-2 que em 82,6% dos casos que expressaram escores 2 e 3 estavam categorizados como carcinoma urotelial puro.

Os pacientes portadores de carcinoma urotelial com diferenciação histológica apresentaram os marcadores moleculares estudados menos positivos do que os carcinomas uroteliais puros, 17,95% versus 82,05% para o p53, 17,65% versus 82,35% para Ciclina D1, 28,57% versus 71,43% para pRb e 17,14% versus 82,86% para HER-2. Nenhum dos marcadores apresentou significância estatística para diferenciar os carcinomas uroteliais puros dos carcinomas com diferenciação histológica ($p>0,05$).

Na presente casuística, os carcinomas com diferenciação histológica apresentaram maior comprometimento linfonodal que os carcinomas uroteliais puros, 48% versus 32,39%, apesar desta diferença não ser significativa ($p=0,163$).

A Tabela 17 demonstra a associação do subtipo-histológico, desfecho clínico e imunoexpressão dos marcadores.

Quando estudamos a associação dos marcadores com o tabagismo nenhum dos marcadores apresentou associação com o hábito de fumar, o p53 ($p=0,696$), Ciclina D1 ($p=0,291$), pRb ($p=0,947$) e HER-2 ($p=0,570$), mas

o tabagismo esteve associado com os 23 pacientes com carcinoma urotelial com diferenciação histológica ($p=0,016$). Dos pacientes com diferenciação histológica, apenas 3 (13,04%) eram não tabagistas, 14 (60,87%) eram tabagistas ativos e 6 (26,96%) ex-tabagistas.

Tabela 17 - Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR com os carcinomas uroteliais puros e uroteliais com diferenciação histológica, com extensão da doença órgão confinada e não órgão confinado e com a progressão clínica

Variável	Histologia		N	P
	Ca urotelial puro N (%)	Ca urotelial com diferenciação N (%)		
Progressão clínica				0,066
Não	48 (81,36)	11 (18,64)	59	
Sim	26 (65,00)	14 (35,00)	40	
Total	74 (74,75)	25 (25,25)	99	
Extensão da invasão				0,001
Órgão confinado pTa-T2	40 (90,91)	4 (9,09)	44	
ÓNC, pT3-pT4	34 (61,82)	21 (38,18)	55	
Total	74 (74,75)	25 (25,25)	99	
Escore p53 no tumor				0,177
0-1	42 (70,00)	18 (30,00)	60	
2-4	32 (82,05)	7 (17,95)	39	
Total	74 (74,75)	25 (25,25)	99	
Escore Ciclina D1 tumor				0,428
0-2	60 (73,17)	22 (26,83)	82	
3-4	14 (82,35)	3 (17,65)	17	
Total	74 (74,75)	25 (25,25)	99	
Escore pRb no tumor				0,693
0	15 (71,43)	6 (28,57)	21	
1-4	59 (75,32)	19 (24,68)	78	
Total	74 (74,75)	25 (25,25)	99	
Escore HER-2 no tumor				0,170
0	45 (70,31)	19 (29,69)	64	
1-3	29 (82,86)	6 (17,14)	35	
Total	74 (74,75)	25 (25,25)	99	

ONC: órgão não confinado

- **RECIDIVA CLÍNICA PÓS-CR:**

A recidiva clínica, ou seja, a progressão da doença pós-CR ocorreu em 41 pacientes (41%) e não esteve associada com a positividade de p53 ($p=0,545$), da Ciclina D1 ($p=0,188$), do pRb ($p=0,536$) e do HER-2 ($p=0,840$).

Apesar de não haver significância, dos tumores que apresentaram hiper-expressão da Ciclina D1, escores 3 e 4, cerca de 89% não experimentaram progressão clínica. Estes dados estão caracterizados na Tabela 18.

No entanto, quando estratificamos somente os marcadores positivos a recidiva clínica ocorreu somente em 11% dos tumores que expressaram Ciclina D1 nos escores 3 e 4 ($p=0,036$).

Tabela 18 - Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico avaliados no espécime da CR com a progressão clínica pós-CR

Marcador	Progressão clínica pós-CR		Total	P
escore no tumor				
p53	Não	Sim		0,545
0	21 (70,00)	9 (30,00)	30	
1	17 (56,67)	13 (43,33)	30	
2+3	7 (58,17)	5 (41,67)	12	
4	14 (51,85)	13 (48,15)	27	
Ciclina D1				0,188
0	15 (53,57)	13 (46,43)	28	
1	15 (62,50)	9 (37,50)	24	
2	10 (43,48)	13 (56,52)	23	
3	10 (66,67)	5 (33,33)	15	
4	8 (88,89)	1 (11,11)	9	
pRb				0,536
0	10 (47,62)	11 (52,38)	21	
2+3	6 (75,00)	2 (25,00)	8	
4	42 (60,00)	28 (40,00)	70	
HER-2				0,840
0	39 (60,94)	25 (39,06)	64	
1	9 (52,94)	8 (47,06)	17	
2	8 (66,67)	4 (33,33)	12	
3	3 (50,00)	3 (50,00)	6	

Escore 0: 0-5%, escore 1: 6-25%, escore 2: 26-50%, escore 3: 51-75%, escore 4: 76-100%

Os escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR não tiveram associação significativa com a progressão clínica após a cirurgia (todos, $p > 0,05$), exceção feita a Ciclina D1 ($p = 0,037$).

Ao estratificar os marcadores em subgrupos, como na Tabela 19, notamos que somente a imunoexpressão da Ciclina D1 apresentou associação com a progressão clínica da doença. Dos casos que

expressavam fortemente a Ciclina D1 (escores 3 e 4), 85% não progrediram após a CR ($p=0,037$).

Tabela 19 - Associação dos escores dos marcadores imunoistoquímico estratificados e agrupados avaliados no espécime da CR com a progressão clínica após a cirurgia

Marcador Escore no tumor	Progressão clínica pós-CR		Total	P
	Não	Sim		
p53				0,525
0-1	35 (60,34)	23 (39,66)	58	
2-4	21 (53,85)	18 (46,15)	39	
Total	56 (57,73)	41 (42,27)	97	
Ciclina D1				0,037
0-2	43 (53,09)	38 (46,91)	81	
3-4	13 (81,25)	3 (18,75)	16	
Total	56 (57,73)	41 (42,27)	97	
pRb				0,289
0	10 (47,62)	11 (52,38)	21	
1-4	46 (60,53)	30 (39,47)	76	
Total	56 (57,73)	41 (42,27)	97	
HER-2				0,786
0	37 (58,73)	26 (41,27)	63	
1-3	19 (55,88)	15 (44,12)	34	
Total	56 (57,73)	41 (42,27)	97	

- Sobrevida Global e câncer específica**

Nenhum dos marcadores estudados teve impacto nas taxas de sobrevida global e câncer específica nesta amostra.

Quando analisamos os tumores estratificados por estádios patológicos, os tumores que não infiltravam a camada muscular apresentaram SCE significativamente maior que aqueles com CBMI e

principalmente sobre aqueles que apresentaram doença não órgão confinada.

Quando estudamos subgrupos específicos, os pacientes que tinham tumores iniciais, antes da cistectomia, com doença músculo invasiva e que expressavam p53 em níveis elevados (escore 4), encontramos piores índices de sobrevida câncer específica ($p=0,012$). Quando estudamos os pacientes com CBNMI na peça de cistectomia encontramos que a expressão do HER-2 acima de 30% esteve associado a pior SCE ($p=0,046$) conforme descrito na Tabela 20.

Tabela 20 - Análise univariada dos parâmetros clínicos, patológicos e de imunoexpressão dos marcadores conforme sobrevida global, SCE e progressão clínica

Variável	Sobrevida global	SCE	Progressão clínica
Gênero	NS	0,08	NS
Número de comorbidades	0,08	NS	NS
Hipertensão arterial sistêmica	0,004	0,079	NS
Tabagistas e ex-tabagistas	0,05	0,024	NS
Estádio patológico T	0,032	0,011	0,034 (não-OC)
Histologia	NS	NS	0,035
Invasão venosa	0,024	0,028	0,069
Densidade linfonodal	0,005	0,002	0,01
Imunoexpressão de p53	0,07*	0,0121*	NS
Imunoexpressão de pRb	NS	NS	0,07**
Imunoexpressão de HER-2	NS	0,046***	NS
Imunoexpressão de Ciclina D1	NS	NS	NS

SCE: Sobrevida câncer-específica NS: não significativo; dx: diagnóstico; pT: estadiamento patológico

* Estratificação: considerando-se apenas o subgrupo de pacientes com doença músculo invasiva ao diagnóstico

** Estratificação: considerando-se apenas o subgrupo de pacientes com doença não músculo invasiva ao diagnóstico

*** Estratificação: considerando-se apenas o subgrupo de pacientes com doença não-músculo invasiva na cistectomia

Ao analisarmos os gráficos de sobrevida por escores dos marcadores, encontramos que não houve associação entre os escores considerados positivos e o desfecho clínico nesta amostra de pacientes.

Estudamos a relação do p53 com SCE por níveis de expressão e não encontramos relação entre a SCE e os escores expressos de p53 (Figura 15).

Mesmo quando agrupamos os casos que foram considerados p53 positivo, não encontramos relação do p53 alterado com o desfecho clínico. (Figura 16).

Fizemos a mesma análise com a Ciclina D1, que não apresentou significância entre o marcador e a imunoexpressão, conforme analisamos nas figuras que seguem (Figuras 17 e 18).

A curva de sobrevida avaliando a expressão do pRb, apesar de não demonstrar significância estatística, demonstra que praticamente a totalidade dos pacientes que não expressaram pRb morreram em decorrência da doença em um período inferior a 1 ano (Figuras 19 e 20).

Repetimos o procedimento do HER-2 e também não encontramos significância quanto a SCE na análise global da coorte por níveis isolados de marcação (Figura 21) e quando estratificamos os casos considerados positivos (Figura 22).

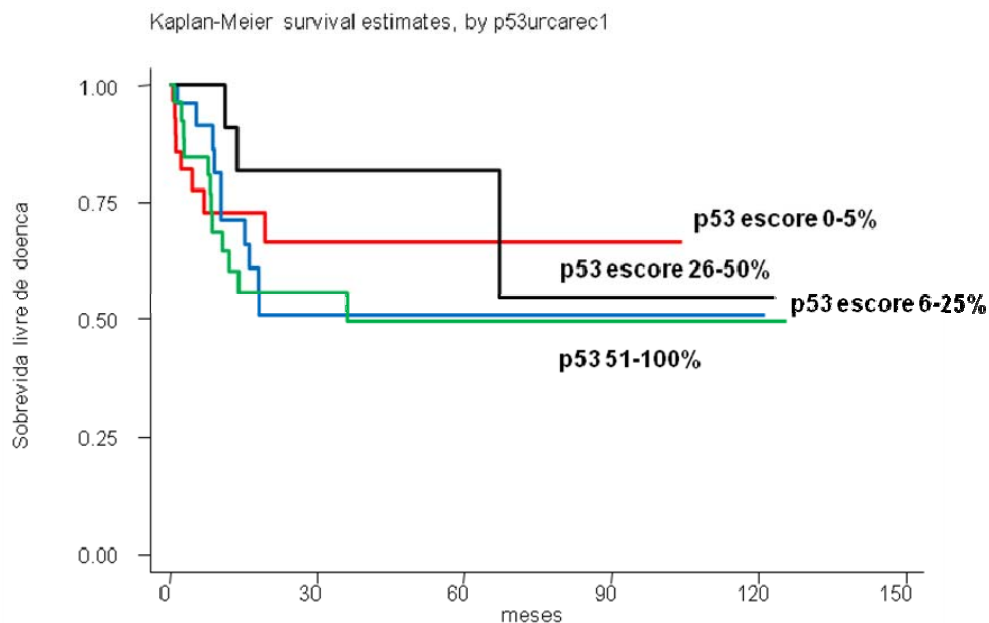


Figura 15 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do p53 (escore 0: N=30, escore 1: N=30, escore 2: N=12 e escore 3+4: N=27), $p=0,5888$

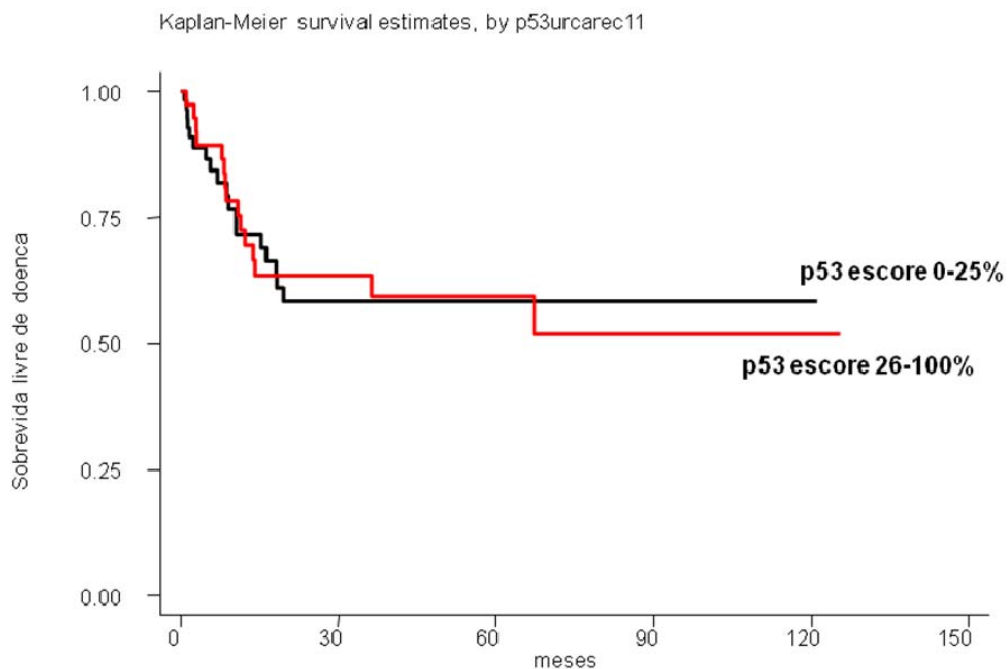


Figura 16 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado e agrupados do p53 (escore 0 e 1, N=60, escore 2-4, N=39), $p=0,9422$

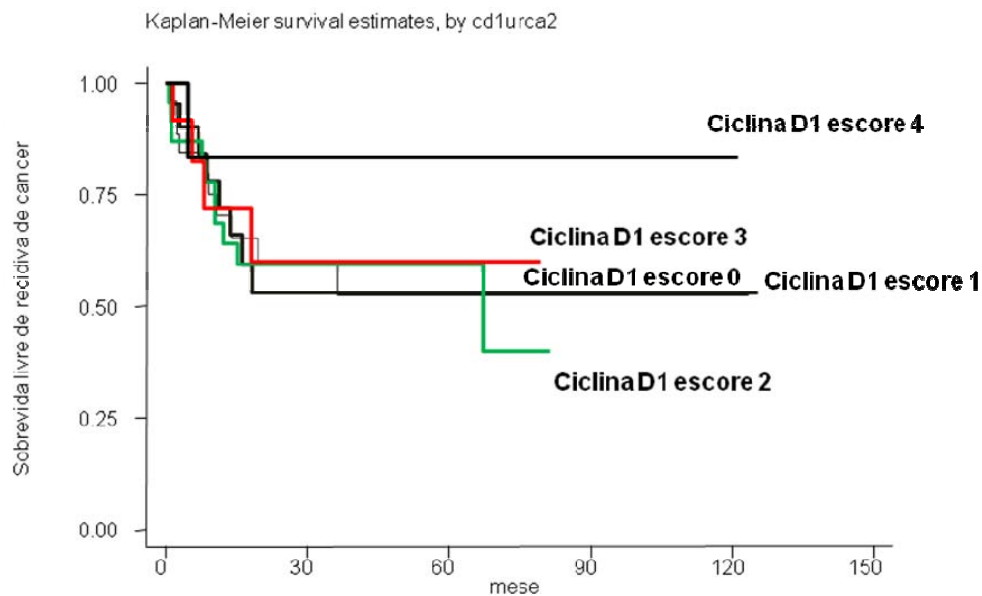


Figura 17 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado da Ciclina D1 (escore 0: N=28, escore1: N= 24, escore 2: N= 23, escore 3: N=15 e escore 4: N=9), $p=0,8235$

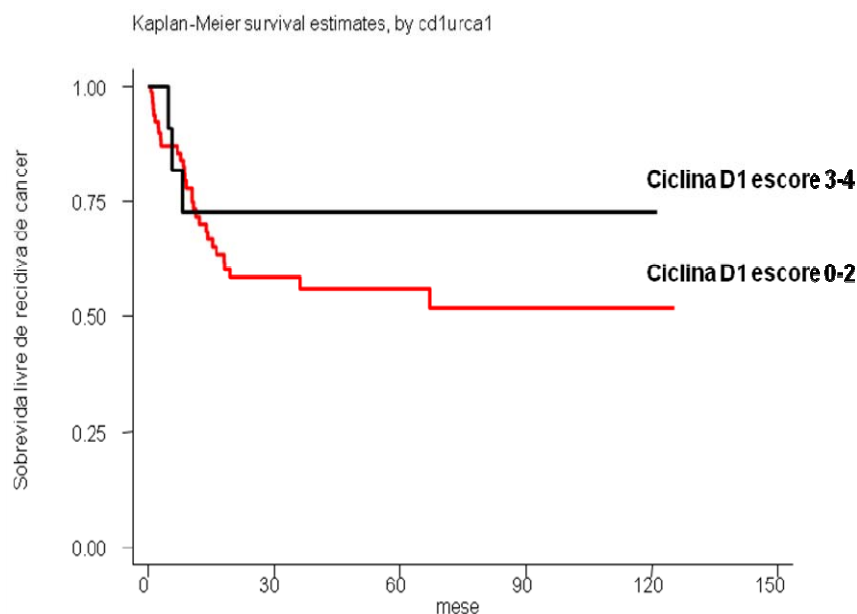


Figura 18 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado da Ciclina D1 (escore 0-2: N=82, escore 3-4: N= 17), $p=0,3165$

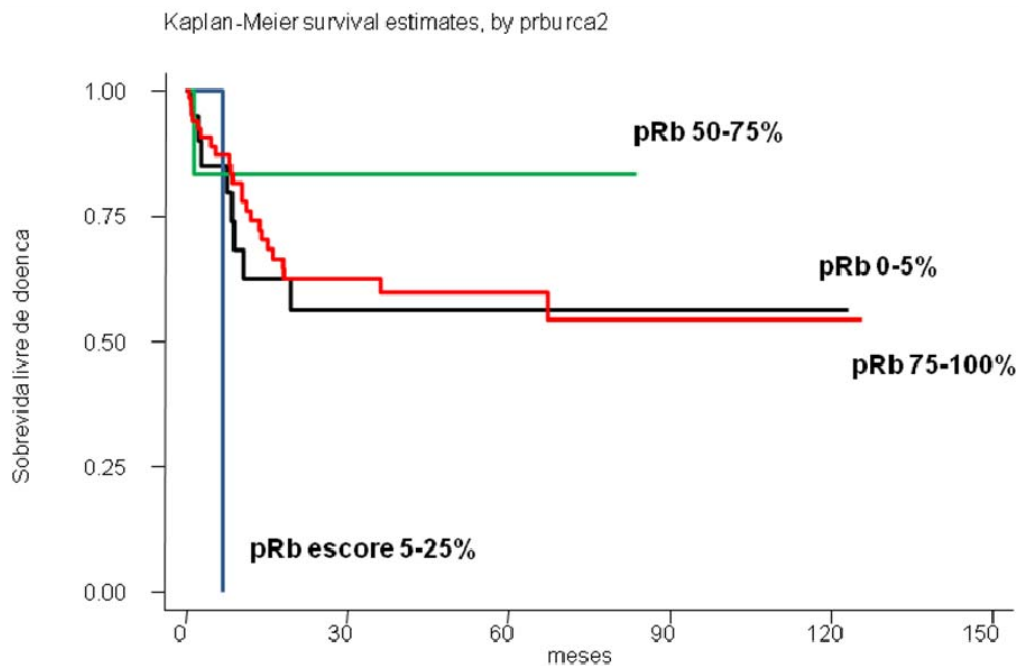


Figura 19 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do pRb (escore 0: N=21, escore 2: N= 1, escore 3: N=7 e escore 4: N=70), $p=0,1944$

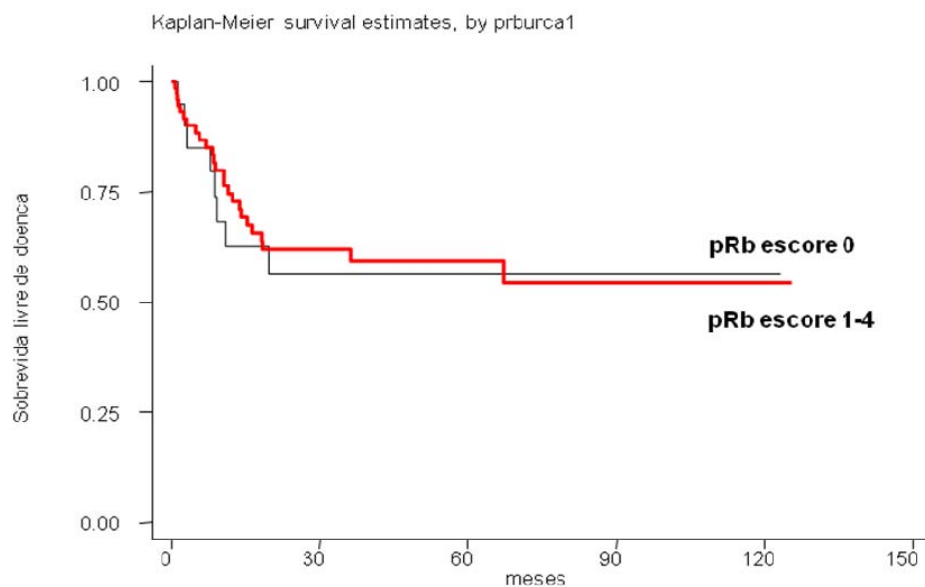


Figura 20 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do pRb (escore 0: N=21, escore 1-4: N= 78, $p=0,7739$)

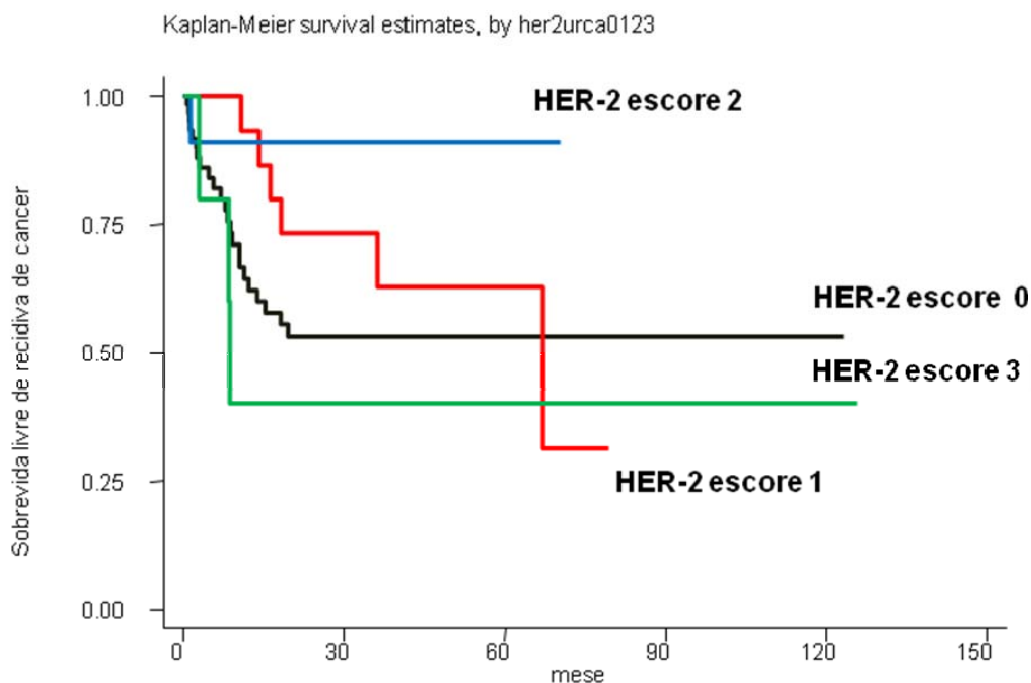


Figura 21 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do HER-2 (escore 0: N=64, escore 1: N=17, escore 2: N=12 e escore 3 N=6), $p=0,2024$



Figura 22 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escore estratificado do HER-2 (escore 0: N=64, escore 1-4: N=35), $p=0,3459$

O número de marcadores positivos também não teve impacto na SCE, mas é interessante o gráfico que mostra sobrevida claramente menor naqueles que apresentaram 3 ou 4 marcadores positivos (Figura 23).

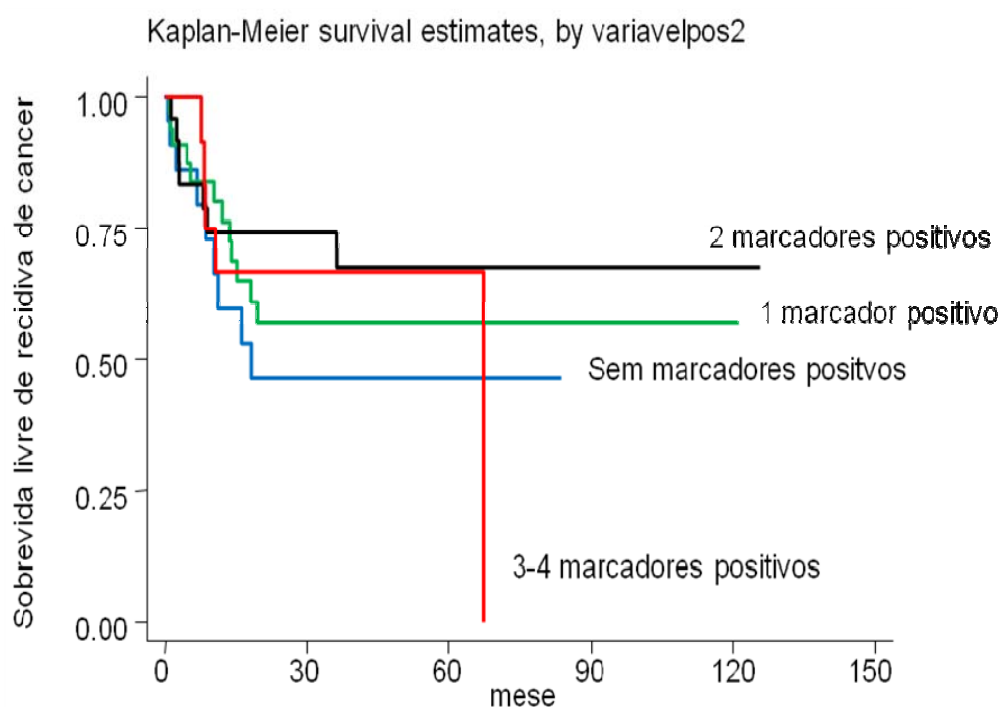


Figura 23 - Curva Kaplan-Meier para sobrevida câncer específica por escores positivos agrupados (Sem marcador positivo, N=23, 1 marcador positivo, N=37, 2 marcadores positivos: n=27 e com 3-4 marcadores positivos: N=12), $p=0,5825$

10 DISCUSSÃO

A cistectomia radical com linfadenectomia é um excelente método para controle local do CB, porém falha em tratar os pacientes que tiveram a doença disseminada. A quimioterapia tem função limitada na doença metastática, portanto é premente o surgimento de novas modalidades terapêuticas para tratamento deste grupo de pacientes (STERNBERG et al. 2001).

Os critérios clínicos e anatomopatológicos são fatores bem estabelecidos em predizer prognóstico em câncer de bexiga, sobretudo naqueles que necessitam ser submetidos à cistectomia radical.

Independente da melhora da técnica cirúrgica, dos cuidados intensivos e da evolução dos quimioterápicos, os pacientes submetidos a CR com linfadenectomia para tratamento do CB, apresentam mortalidade câncer específica em 5 anos, em elevados 40 a 50%. As recidivas clínicas geralmente levam os pacientes ao óbito, devido aos limitados recursos disponíveis para os casos que escapam ao tratamento convencional (SHARIAT et al. 2006).

Com base nesses casos, o estudo dos biomarcadores vem emergindo ao longo dos últimos 20 anos. O estudo das vias moleculares associadas ao surgimento e desenvolvimento das neoplasias vesicais tem apresentado um grande avanço neste período (SHARIAT et al. 2008). A presença de expressão de certas proteínas no CB pode distinguir aquele de padrão

biológico mais grave, bem como predizer quais pacientes deveriam receber um tratamento mais agressivo precocemente ou alguma forma de adjuvância (SHARIAT et al. 2008; CASTILLO-MARTIN et al. 2010).

Dentre todos os marcadores biomoleculares estudados, sem dúvidas o p53 é o que mais ganhou destaque na literatura médica.

A presença do p53 expresso nos CB é mais frequente nos CBMI, muito embora seja frequente encontra-lo expresso nos CBNMI.

Em estudo com mais de 1700 pacientes com CB, em diversos estádios patológicos Schnmitz-Draguer et al encontraram p53 expresso em 25% dos CBNMI e em 48% dos CBMI (SCHMITZ-DRAGER et al. 1999).

Em nossa casuística encontramos o p53 positivo à imunoistoquímica (escores 2 a 4) em cerca de 40% dos casos, sendo que 7 (7%) eram CBNMI e 32(32%) CBMI. Provavelmente esse nível elevado de p53 se deve as características da coorte onde a maioria dos casos se tratavam de doença de elevado estágio patológico.

Os trabalhos que estudam a mutação do p53 em CB demonstram claramente que a hiper-expressão a imunoistoquímica está associada a piores resultados de sobrevida câncer específica. SHARIAT et al. (2010) demonstraram que os pacientes com CB não órgão confinado que expressavam p53 em níveis maior do que 10% apresentam 1,6X mais chances de morrer por CB do que o grupo controle.

HERR et al. (1999) encontraram pior SCE nos pacientes com CBMI porém, os casos estudados foram doença órgão confinado (pT2).

Em nossa coorte, mesmo estratificando os pacientes em CBNMI, CBMI e CB com doença não órgão confinada, o p53 não demonstrou significância em predizer prognóstico. Exceto quando estudamos o grupo de pacientes com CBMI no diagnóstico pré cistectomia e somente quando foi adotado ponto de corte de imunoexpressão acima de 80%, ou seja, escore 4. Neste grupo, o p53 hiperexpresso foi importante em predizer sobrevida câncer específica ($p=0,0121$).

Provavelmente, por estarmos analisando pacientes com tumores em estágio patológico avançado, (78% de doença não órgão confinada, 36% com metástase linfonodal) o uso do marcador biomolecular talvez tenha perdido a importância frente à gravidade dos pacientes, demonstrando que a maior relevância dos marcadores está em estratificar aqueles pacientes onde o status clínico e patológico não seja tão avançado.

Quando comparamos a correlação entre os marcadores estudados, notamos que nos tumores onde o p53 estava fortemente expresso (escore 4) cerca de 57% destes pacientes apresentaram ausência total de expressão pRb ($p=0,003$), fato que deve ser esperado, visto que tanto p53 quanto pRb fazem parte da via tumoral envolvida na gênese dos tumores de alta agressividade.

HE et al. (2009) encontraram ausência de expressão do pRb associado a expressão positiva (considerado como p53 expresso em mais de 10%) em 60% dos casos estudados, sendo que estes casos apresentaram pior sobrevida câncer específica do que os que não expressavam nenhum ou somente um dos marcadores.

É conhecida a correlação do p53 com o pRb durante a dinâmica do ciclo celular. O p53 quando inativo geralmente se acumula no núcleo, explicando o porque da expressão aumentada quando avaliado pela imunohistoquímica. Já o pRb quando inativo geralmente se manifesta pela ausência de expressão, muito embora, seja bem estabelecido que a expressão elevada do pRb pode corresponder a sua forma hiperfosforilada e inativa. Esse achado possivelmente se deve a Ciclina D1 hiperexpressa ou deleção de p16 (CHATTERJEE et al. 2004).

Em nossa amostra consideramos como mutação do RB somente quando houve ausência de expressão do marcador, visto que ao compararmos com os controles não houve associação do Rb hiperexpresso nos tumores.

Encontramos 20% dos tumores com ausência de expressão do pRb, sendo que desses tumores, 85% se apresentavam como doença não órgão confinada.

Na literatura, o pRb costuma estar mutado em metade dos CB, sobretudo no CBMI (HE et al. 2009).

Provavelmente em nossos casos, onde o pRb foi considerado mutado, foram mais baixos que os descritos por outros autores, pois em nossa validação interna ou seja, analisando de nossos casos com tumores e os controles, não conseguimos encontrar a hiperexpressão do pRb (acima do escore 2) como uma anormalidade. Frisando, que 70% dos nossos casos controles apresentaram pRB expressos no escore 4. Porém quando analisamos as curvas de sobrevida, ainda que sem demonstrar significância,

os casos que expressaram pRb em escore 4 tiveram curvas praticamente idênticas ao dos casos onde havia ausência de expressão.

Ao analisarmos o padrão de expressão da Ciclina D1, encontramos que 17% dos casos apresentavam Ciclina D1 nos escores 3 ou 4, considerados positivos em nossa análise. Nos estádios mais avançados ocorre uma diminuição progressiva da expressão da Ciclina D1. Sete por cento dos casos considerados Ciclina D1 positivo apresentavam doença não órgão confinada frente a 37% de doença não órgão confinada nos casos com expressão 0 e 1 ($p < 0,002$).

TUT et al. (2001) analisando amostra igualmente heterogênea, envolvendo CBNMI (97 casos) e CBMI (53 casos) encontraram a expressão da Ciclina D1 alterada, adotando o ponto de corte a imunoistoquímica de 50%, em 89% dos CBNMI e em 74% dos CBMI. Nesta amostra os autores encontraram que a Ciclina D1 hiper-expressa esteve associada com tumores de baixo grau e não músculo invasivo, corroborando a hipótese que os tumores avançados seguem uma via independente da Ciclina D1. Esses resultados tão expressivos, são conflitantes com a do presente estudo, onde a positividade da Ciclina D1 ocorreu em apenas 17% dos casos.

BRINGUIER et al. (1996) encontraram em casuística com 46 pacientes, que os pacientes com tumores com hiperexpressão da Ciclina D1 (>50% das células com expressão) apresentaram evolução clínica menos agressiva que os que não expressavam ou expressavam em menor intensidade.

Esses achados são compatíveis com nossos resultados, onde os tumores que tinham expressão da Ciclina D1 maior 50%, apresentavam doença em estádios patológicos menos avançados.

Ao compararmos a expressão do HER-2 com a do p53, encontramos que aqueles que hiperexpressavam o HER-2 no escore 3, 85% encontravam-se com p53 nos escores 3 e 4, ainda que este achado não tenha apresentado significância ($p=0,15$) sugerindo uma possível correlação entre estes marcadores. É importante frisar que tivemos somente 5 pacientes nesta condição, o que seguramente limita a qualidade da análise.

O HER-2 é um receptor transmembrana da tirosino-Kinase, considerado fundamental para o crescimento, sobrevivência e migração celular. Vem sendo amplamente estudado em mama, onde cerca de 20% dos tumores têm mutações do HER-2 e o uso de terapias alvo moleculares com anticorpo anti-HER-2 (trastuzumab) é uma realidade em neoplasias de mama (YARDEN 2001).

Transpondo para o CB, ao encontrarmos associação positiva entre o HER-2 hiper-expresso e eventos adversos, a terapia alvo molecular poderia ser oferecida.

Ao analisarmos a expressão do HER-2 encontramos que a hiperexpressão (escore 3) esteve associados a CB não órgão confinado em cerca de 40% dos casos ($p=0,037$). Porém quando avaliamos a expressões menos intensa (escore 2), não encontramos correlação da expressão do HER-2 com estágio patológico.

BOLENZ e SHARIAT (2010) estudaram 198 pacientes com CB em diversos estádios patológicos, inclusive com doença linfonodal. Os autores encontraram que aqueles casos onde o HER-2 era expressos em mais de 10% , estiveram mais associados com invasão angiolinfática, recidiva clínica e mortalidade câncer específica.

Dentre todos os marcadores por nós estudados, o HER-2 é o que menos se conhece da associação com o CB, com dados divergentes na literatura sobre o papel deste receptor da tirosino-kinase na evolução do CB.

Quando analisamos o número de marcadores hiperexpressos não houve correlação entre o número de marcadores positivos com desfecho clínico. Entretanto, todos os pacientes que apresentaram 3 ou 4 marcadores hiperexpressos morreram pela doença no seguimento clínico. Provavelmente, esse achado se deve ao pequeno número de casos (n=12) nesta sub-população.

Esses achados diferem dos achados de SHARIAT et al. (2012) que ao estudar o papel dos marcadores p53, pRb, p21 e p27 demonstrou que quando 3 ou mais marcadores estavam alterados, a sobrevida global foi mais baixa e a recidiva clínica mais frequente, com significância estatística.

Quando analisamos os achados clínicos-patológicos de nossa casuística encontramos alguns dados interessantes. Os casos que na peça de cistectomia apresentaram somente CIS tiveram desfecho clínico desfavorável em comparação com todos os outros estádios, com progressão clínica em 75%. Muito provavelmente, isso se deve a característica dos tumores primários. Dos 4 casos nesta situação, 3 eram CBMI no tumor

inicial, refletindo ressecção adequada, porém em doença inicialmente muito agressiva. A densidade linfonodal (número de linfonodos positivos sobre o total de linfonodos ressecados) teve correlação com a sobrevida global, câncer-específica e progressão clínica (associação positiva para todas as sobrevidas, $p < 0,05$).

Apesar de não ser o foco deste trabalho, esses achados corroboram o que há muito já se discute na literatura sobre o papel curativo da linfadenectomia no CB. WRIGHT et al. (2008) demonstrou melhora da sobrevida global e câncer-específica, quando se ressecou mais de 10 linfonodos no produto da linfadenectomia, em detrimento dos casos onde a extensão foi menor.

Merece destaque, o fato que o tabagismo está associado não só com a sobrevida global, esperado para uma comorbidade muito prevalente no CB, mas também com a sobrevida câncer específica. Lembramos que em nossa amostra mais de 70% dos casos eram compostos por tabagistas e ex-tabagistas. Esses casos apresentaram pior SCE quando comparados ao grupo dos não tabagistas ($p = 0,024$). Encontramos que o tabagismo esteve associado com as variantes histológicas do CB, demonstrando seu papel na indiferenciação tumoral e desta forma contribuindo para o desfecho clínico desfavorável.

Nossos dados são compatíveis com os achados de RINK et al. (2012) que avaliaram mais de 1500 pacientes submetidos a CR, em estágio variados e encontraram que os tabagistas e ex-tabagistas apresentaram

maior incidência de recidiva clínica e menor SCE, comparados aos pacientes que não tinham o hábito de fumar.

Testamos a correlação entre os marcadores estudados, sobretudo o p53, com o tabagismo, e nessa casuística não houve uma associação significativa.

Na nossa amostra encontramos que os fatores clínico-patológicos foram significativamente mais importantes em predizer o desfecho clínico dos pacientes submetidos a CR do que os imunomarcadores estudados.

Na presente casuística, com a maioria dos casos em estágio patológico avançado, com doença linfonodal em 36% deles, talvez neste grupo de pacientes, com tumores tão agressivos, o papel dos marcadores tenha sido menos importante.

11 CONCLUSÃO

Dos marcadores que representavam a mesma via tumoral, ou seja, os marcadores do ciclo celular, apenas o p53 e pRb correlacionaram-se entre si.

A hiper-expressão do HER-2, no escore 3, se associou com piora na sobrevida câncer-específica, no subgrupo de pacientes com doença não músculo invasiva no espécime de CR.

A hiper-expressão do p53 esteve associada a pior sobrevida câncer específica no subgrupo de pacientes, que de início apresentavam doença músculo invasiva e que expressaram p53 no escore 4.

Os marcadores estudados não influenciaram as taxas de sobrevida global e progressão clínica da doença.

Nenhum dos marcadores teve impacto nos desfechos clínicos e oncológicos quando analisamos a coorte globalmente, ou seja, sem estratificar em subgrupos

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bolenz C, Shariat SF. Human epidermal growth factor receptor 2 expression status provides independent prognostic information in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. **BJU Int** 2010; 106:1216-22.

Brauers A, Buettner R, Jakse G. Second resection and prognosis of primary high risk superficial bladder cancer: is cystectomy often too early? **J Urol** 2001; 165:808-10.

Brennan P, Bogillot O, Cordier S, et al. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. **Int J Cancer** 2000; 86:289-94.

Bringuier PP, Tamimi Y, Schuuring E, Schalken J. Expression of cyclin D1 and EMS1 in bladder tumours; relationship with chromosome 11q13 amplification. **Oncogene** 1996; 12:1747-53.

Brismar J, Gustafson T. Bone scintigraphy in staging of bladder carcinoma. **Acta Radiol** 1988; 29:251-2.

Brown FM. Urine cytology. It is still the gold standard for screening? **Urol Clin North Am** 2000; 27:25-37.

Bussab WO, Morettin PA. **Estatística básica**. 5ª ed. São Paulo: Saraiva; 2002. Qui-quadrado de Pearson; p.173-87.

Casetta G, Gontero P, Russo R, Pacchioni D, Tizzani A. p53 expression compared with other prognostic factors in OMS grade-I stage-Ta transitional cell carcinoma of the bladder. **Eur Urol** 1997; 32:229-36.

Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. **Urol Oncol** 2010; 28:401-8.

Chang SS, Hassan JM, Cookson MS, Wells N, Smith JA Jr. Delaying radical cystectomy for muscle invasive bladder cancer results in worse pathological stage. **J Urol** 2003; 170:1085-7.

Chatterjee SJ, George B, Goebell PJ, et al. Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer **J Pathol** 2004; 203:762-70.

Chrouser K, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. **J Urol** 2005; 174:107-10; discussion 110-1.

Cina SJ, Epstein JI, Endrizzi JM, Harmon WJ, Seay TM, Schoenberg MP. Correlation of cystoscopic impression with histologic diagnosis of biopsy specimens of the bladder. **Hum Pathol** 2001; 32:630-7.

Cordon-Cardo C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. **Am J Pathol** 1995; 147:545-60.

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

Cote RJ, Dunn MD, Chatterjee SJ, et al. Elevated and absent pRb expression is associated with bladder cancer progression and has cooperative effects with p53. **Cancer Res** 1998; 58:1090-4.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:1435-48.

Esrig D, Elmajian D, Groshen S, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. **N Engl J Med** 1994; 331:1259-64.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell** 1989; 57:1083-93.

Fradet Y, Lacombe L. Can biological markers predict recurrence and progression of superficial bladder cancer? **Curr Opin Urol** 2000; 10:441-5.

Hain SF, Maisey MN. Positron emission tomography for urological tumours. **BJU Int** 2003; 92:159-64.

Halling KC, King W, Sokolova IA, et al. A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. **J Urol** 2000; 164:1768-75.

Hautmann RE, Abol-Enein H, Hafez K, et al. Urinary diversion. World Health Organization (WHO) Consensus Conference on Bladder Cancer, **Urology** 2007; 69(Suppl):17-49.

He F, Mo L, Zheng XY, et al. Deficiency of pRb family proteins and p53 in invasive urothelial tumorigenesis. **Cancer Res** 2009; 69:9413-21.

Heney NM. Natural history of superficial bladder cancer. Prognostic features and long term disease course. **Urol Clin North Am** 1992; 19:429-33.

Herr HW. The value of second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. **J Urol** 1999; 162:74-6.

Herr HW, Bajorin DF, Scher HI, Cordon-Cardo C, Reuter VE. Can p53 help select patients with invasive bladder cancer for bladder preservation? **J Urol** 1999; 161:20-2; discussion 22-3.

Herr HW, Sogani PC. Does early cystectomy improve the survival of patients with high risk superficial bladder tumors? **J Urol** 2001; 166:1296-9.

Herr HW, Faulkner JR, Grossman HB, et al. Surgical factors influence bladder cancer outcomes: a cooperative group report. **J Clin Oncol** 2004; 22:2781-9.

Herranz-Amo F, Diez-Cordero JM, Verdú-Tartajo F, Bueno-Chomón G, Leal-Hernández F, Bielsa-Carrillo A. Need for intravenous urography in patients with primary transitional carcinoma of the bladder? **Eur Urol** 1999; 36:221-4.

Holmang S, Andius P, Hedelin H, Wester K, Busch C, Johansson SL. Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. **J Urol** 2001; 165:1124- 8; discussion 1128-30.

Huguet J, Crego M, Sabaté S, Salvador J, Palou J, Villavicencio H. Cystectomy in patients with high risk superficial bladder tumors who fail intravesical BCG therapy: pre-cystectomy prostate involvement as a prognostic factor. **Eur Urol** 2005; 48:53-9; discussion 59.

Jahnsen S, Wiklund F, Duchek M, et al. Results of Second-look resection after primary resection of T1 tumour of the urinary bladder. **Scand J Urol Nephrol** 2005; 39:206-10.

Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:10-30.

Jensen JB, Høyer S, Jensen KM. Incidence of occult lymph-node metastasis missed by standard pathological examination in patients with bladder cancer undergoing radical cystectomy. **Scan J Urol Nephrol** 2011; 45:419-24.

Jimenez RE, Hussain M, Bianco FJ Jr, et al. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2440-7.

Khadra MH, Pickard RS, Charlton M, Powell PH, Neal DE. A prospective analysis of 1,930 patients with hematuria to evaluate current diagnostic practice. **J Urol** 2000; 163:524-7.

Kim JK, Park SY, Ahn HJ, Kim CS, Cho KS. Bladder cancer: analysis of multidetector row helical CT enhancement pattern and accuracy in tumor detection and perivesical staging. **Radiology** 2004; 231:725-31.

Latif Z, Watters AD, Dunn I, Grigor KM, Underwood MA, Bartlett JM. HER-2/neu overexpression in the development of muscle-invasive transitional cell carcinoma of the bladder. **Br J Cancer** 2003; 89:1305-9.

Leissner J, Koeppen C, Wolf HK. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in urothelial bladder cancer treated with radical cystectomy. **J Urol** 2003; 169:955-60.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31.

Linzer DI , Levine A J. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell** 1979; 17:43-52.

Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. **J Urol** 1985; 133:1034-5.

Losa A, Hurle R, Lembo A. Low dose bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder: long-term results. **J Urol** 2000; 163:68-71.

Merz VW, Marth D, Kraft R, Ackermann DK, Zingg EJ, Studer UE. Analysis of early failures after intravesical instillation therapy with bacille Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder. **Br J Urol** 1995; 75:180-4.

Messing EM. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein A, editors. **Campbell's urology**. 8^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2002. p.2732-84.

Mills RD, Fleischmann A, Studer UE. Radical cystectomy with an extended pelvic lymphadenectomy: rationale and results. **Surg Oncol Clin N Am** 2007; 16:233-45.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Morgenbesser SD, Williams BO, Jacks T, DePinho RA. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. **Nature** 1994, 371:72-4.

Nieder AM, Porter MP, Soloway MS. Radiation therapy for prostate cancer increases subsequent risk of bladder and rectal cancer: a population based cohort study. **J Urol** 2008; 180:2005-9; discussion 2009-10.

Oosterlinck W, Lobel B, Jakse G, et al. European Association of Urology (EAU) Working Group on Oncological Urology. Guidelines on bladder cancer. **Eur Urol** 2002; 41:105-12.

Oosterlinck W. Guidelines on diagnosis and treatment of superficial bladder cancer. **Minerva Urol Nefrol** 2004; 56:65-72.

Paik ML, Scolieri MJ, Brown SL, Spirnak JP, Resnick MI. Limitations of computerized tomography in staging invasive bladder cancer before radical cystectomy. **J Urol** 2000; 163:1693-6.

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

Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. **World J Urol** 2009; 27:289-93.

Rink M, Zabor EC, Furberg H, et al. Impact of smoking and smoking cessation on outcomes in bladder cancer patients treated with radical cystectomy. **Eur Urol** 2012; pii:S0302-2838(12)01414-5.

Rosenberg CL, Kim HG, Shows TB, Kronenberg HM, Arnold A. Rearrangement and overexpression of D11S287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in benign parathyroid tumours. **Oncogene** 1991; 6:449-53.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al: Nuclear overexpression of p53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:53-9.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Association of P53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. **J Urol** 1994; 152:388-92.

Sato K, Moriyama M, Mori S, et al. An immunohistologic evaluation of CerbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. **Cancer** 1992; 70:2493-8.

Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Non-invasive urothelial tumours. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **Pathology & genetics tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press, 2004. p.110.

[SBU] Sociedade Brasileira de Urologia. **Diretrizes no tratamento do câncer urológico**. Rio de Janeiro: Editora DOC; 2009.

Schmitz-Drager BJ, Goebell PJ, Heydthausen M. The International Study Initiative on Bladder Cancer (ISBC): P53 immunohistochemistry as a prognostic marker in bladder cancer: the ISBC combined analysis. **J Urol** 1999; 153(Suppl):161.

Shariat SF, Karakiewicz PI, Palapattu GS, et al. Outcomes of radical cystectomy for transitional cell carcinoma of the bladder: a contemporary series from the Bladder Cancer Research Consortium. **J Urol** 2006; 176:2414–22.

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

Shariat SF, Bolenz C, Godoy G, et al. Predictive value of combined immunohistochemical markers in patients with pT1 urothelial carcinoma at radical cystectomy. **J Urol** 2009; 182:78-84.

Shariat SF, Bolenz C, Karakiewicz PI, et al. p53 expression in patients with advanced urothelial cancer of the urinary bladder **BJU Int** 2010; 105:489-95.

Shariat SF, Chromecki TF, Cha EK, et al. Risk stratification of organ confined bladder cancer after radical cystectomy using cell cycle related biomarkers. **J Urol** 2012; 187:457-62.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev** 1999; 13:1501-12.

Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. **Br J Cancer** 1997; 75:1788-92.

Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. **J Urol** 2003; 169:1219-28.

Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C, editors. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2010. Tumores de bexiga; p.262-5.

Solsona E, Iborra I, Rubio J, Casanova J, Almenar S. The optimum timing of radical cystectomy for patients with recurrent high-risk superficial bladder tumour. **BJU Int** 2004; 94:1258-62.

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.

Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: longterm results of a standard procedure. **World J Urol** 2006; 24:296-304.

Stenzl A, Burger M, Fradet Y, et al. Hexaminolevulinate guided fluorescence cystoscopy reduces recurrence in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. **J Urol** 2010; 184:1907-13.

Sternberg CN, de Mulder PH, Schornagel JH, et al. Randomized phase III trial of high-dose-intensity methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) chemotherapy and recombinant human granulocyte colonystimulating factor versus classic MVAC in advanced urothelial tract tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer Protocol, 30924. **J Clin Oncol** 2001; 19:2638-46.

Sylvester RJ, Brausi MA, Kirkels WJ, et al. EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Group. Long-term efficacy results of EORTC Genito-Urinary Group randomized phase 3 study 30911 comparing intravesical instillations of epirubicin, Bacillus Calmette-Guérin, and Bacillus Calmette-Guérin plus isoniazid in patients with intermediate and high-risk stage Ta T1 urothelial carcinoma of the bladder. **Eur Urol** 2010; 57:766-73.

Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. **Br J Cancer** 2001; 84:270-5.

Vaidya A, Soloway MS, Hawke C, Tiguert R, Civantos F. De novo muscle invasive bladder cancer: is there a change in trend? **J Urol** 2001; 165:47-50.

van der Meijden A, Oosterlinck W, Brausi M, Kurth KH, Sylvester R, de Balincourt C. Significance of bladder biopsies in Ta,T1 bladder tumors: a report from the EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Cooperative Group. EORTC-GU Group Superficial Bladder Committee. **Eur Urol** 1999; 35:267-71.

Wasco MJ, Daignault S, Bradley D, Shah RB. Nested variant of urothelial carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 30 pure and mixed cases. **Hum Pathol** 2010; 41:163-71.

Wright JL, Lin DW, Porter MP. The association between extent of lymphadenectomy and survival among patients with lymph node metastases undergoing radical cystectomy. **Cancer** 2008; 112:2401-8.

Yarden Y. Biology of HER-2 and its importance in breast cancer. **Oncology** 2001; 61(Suppl):1-13.

Anexo 1 - Ficha de Levantamento

CISTECTOMIA RADICAL

Serviço de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo

1. Nome: _____ ID : ____/____/____
2. RGH: _____ |____|____|____|____|____|
3. Idade na data da cirurgia: _____|____|
4. Sexo: |0| masc. |1|feminino _____|____|
5. Raça: |0| branca |1|parda |2| negro |3| amarela _____|____|
6. Doenças associadas: |0| não |1|HAS |2| DPOC |3| DM |4|obesidade |5| RXt
7. |6| outros _____|____|
8. Tabagista: |0| não |1|sim |2| ex-fumante, há _____ anos _____|____|
9. Número de cigarros: |1| <10 cig/d. |2| 11-20 |3| >20 _____|____|
10. Tempo de tabagismo: |0|<1a |1|1-5 |2| 5-10 |3|>10 |4|>20 |5|>30 |____|
10. Hidronefrose: |0| sem |1|unilateral |2| bilateral |____|
11. Grau na biópsia |1|alto |2|baixo |9| ignorado N° das lâminas _____
12. Citologia oncológica urinária: |0| neg. |1|classe 3 |2| pos: |____|
13. Tratamento prévio: |0| não |1|sim |____|
14. Data dos 1º sintomas da doença: ____/____/____
15. Tipo de trat. prévio: |0|não |1|RTU |2|cistect. parcial |3|1+2|____|
16. Tumor primário: |0|superficial |1| invasivo |____|
17. BCG: |0| não |1| sim |____|
18. 1º Ciclo Semanal: |0| não |1|sim |____|
19. Cistoscopia: |0|normal |1|recidiva |2|recidiva com progressão |____|
20. 1º Ciclo quinzenal e/ou mensal: |0|não |1|sim |____|
21. Número de RTU para recidiva: |0| |1| |2| |3| |4| |5| |____|
22. Data da 1ª recidiva: (cirurgia) ____/____/____
23. Progressão da doença: |0| não |1|sim |____|
24. Indicação da cistectomia |1|prog |2|falha BCG |3|imposs ress |4|mult recid
|5| T2 |____|
25. Neo-adjuvância |0|não |1|Qtx |2|RTx |3|Qtx + RTx |____|
26. Hb pré-operatório: |____|
27. Creatinina pré-op: |____|
28. Data da cirurgia: ____/____/____
29. Risco cirúrgico ASA: |1| |2| |3| |4| |____|
30. Tempo de cirurgia (min.): |____|
31. Reconst trato urinário: |1|Bricker |2| Neobexiga |____|

32. Tempo de internação (dias):
33. Transfusão de sangue: |0| não |1| sim
34. Volume de transfusão (ml) :
35. Hb pós-operatório:
36. Creatinina pós-operatória:
37. Fator T: |0|T0 |1|Ta |2|T1 |3|T2 |4|T3a |5|T3b |6|T4.....
38. Fator N: |0| N0 |1|N1 |2|N2 |3|N3
39. Fator M: |0|M0 |1| M1
40. Tipo histológico: |1|CCT |2|CEC |3|adenoca |4|sarcoma
41. Grau na peça: |1| alto |2| baixo N° das lâminas.....
42. Invasão vascular e/ou linfática |0| não |1|sim
43. Multifocalidade: |0|não |1|sim
44. N° de lesões: |1|<3 |2|4 a 6 |3|7 a 10 |4|>10
45. Presença de CIS associado: |0|não |1|sim
46. Presença de tu polipóide na uretra prostática: |0|não |1|sim
47. Tamanho do tumor: |1|<2,5cm |2|3 a 5cm |3|>5cm
48. Congelação de uretra: |0| não |1|positiva |2|negativa
49. Complicações imediatas: |0|não |1|evisceração |2|IRA |3|pneumonia
|4|fístula urinária |5|abscesso pélvico |6|íleo prolongado |9|bridas
|10|obstrução sonda por muco |11|fístula entérica |12| outros
50. Re-operação: |0|não |1|sim
51. Data da re-operação: / /
52. Qt adjuvante: |0|não |1|sim
53. Complicações tardias: |0|não |1|incontinência urinária |2|retenção urinária
|3|hidronefrose |4|pielonefrite |5| infecção do Pouch |6|fístula urinária
|7|impotência |8|fístula neobexiga para vagina |10| outros.....
54. Continência diurna após 1 ano:
|0|incontinente |1|leve |2|moderada |3|grave |4|retentor.....
55. Continêncianoturna após 1 ano:
|0|incontinente |1|leve |2|moderada |3|grave |4|retentor
56. Potência após 1 ano: |1| impotente |2| ereção parcial |3| ereção plena |4| ereção
plena com droga |5| prótese
57. Data da Falha: / /
58. Falha: |0|não |1|local |2|uretra |3|fígado |4|pulmão |5|SNC |6|óssos |7| outros
59. Tratamento da falha: |0|não |1|QT |2|Rxt |3|cirurgia
60. Data do último seguimento: / /
61. STATUS:
|1| Vivo ass. |2|Vivo c/Ca |3| Morte Ass |4| Morte Ca |5| Morte trat |6| PV...