

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS
LAHEY CLINIC MEDICAL CENTER
DEPARTMENT OF UROLOGY
ROBERT E. WISE MD - RESEARCH AND EDUCATION INSTITUTE

TESE DE DOUTORADO

**A TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM TUMORES UROTELIAIS DE
BEXIGA: IDENTIFICAÇÃO E SIGNIFICADO PROGNÓSTICO DA
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO COMPLEXO CADERINA-CATENINA EM
MICROARRANJOS DE TECIDOS**

ALUNO: BRASIL SILVA NETO

ORIENTADOR: PROF. DR. WALTER JOSÉ KOFF

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOHN A. LIBERTINO

Porto Alegre, Dezembro de 2008

S586t **Silva Neto, Brasil**

**A transição epitélio-mesenquimal em tumores
uroteliais de bexiga : identificação e significado
prognóstico da expressão de proteínas do
complexo caderina-catenina em microarranjos de
tecidos / Brasil Silva Neto ; orient. Walter José Koff
; co-orient. John A. Libertino. – 2008.**

46 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Neoplasias da bexiga urinária 2. Marcadores biológicos de tumor 3. Moléculas de adesão celular 4. Cateninas 5. Caderinas 6. Metástases neoplásicas I. Koff, Walter José II. Libertino, John A. III. Título.

NLM: WJ 504

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Agradecimentos

À CAPES, por proporcionar a realização deste projeto no exterior, mostrando organização exemplar na condução do processo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Medicina e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por proporcionar a minha formação acadêmica e por terem sido a minha segunda casa nos últimos dezesseis anos.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, seus professores e funcionários.

Ao Serviço de Urologia e todos os seus membros, pela contribuição à minha formação.

À Lahey Clinic Medical Center, seus Professores e Funcionários, em especial aos membros do Departamento de Urologia e do Instituto de Pesquisas.

Aos colegas Dr. Mauro Weiss, Dr. Renato Scaletsky e Dr. Jeverson Wagner, pela amizade e suporte durante a realização deste projeto.

À Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, pelo incentivo constante e pelo inestimável auxílio no processo inicial deste projeto.

Ao Dr. Milton Berger, cuja trajetória profissional eu me espelho, pela amizade, apoio e incentivo sempre presentes durante todo o período que envolveu este trabalho.

À Dra. Nadine Clausell, a minha profunda gratidão pelo auxílio inestimável na idealização e estruturação do plano de realização do estágio de Doutorando no

exterior. Por fazer-se sempre presente, mesmo que à distância, dando-nos suporte nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Dr Walter José Koff, a minha admiração pela grande capacidade profissional e competência com que conduz o Serviço de Urologia. Meu profundo agradecimento por aceitar-me como seu aluno de pós-graduação e pela confiança depositada em mim para a criação e execução deste projeto.

Ao Dr. John A. Libertino, por aceitar a realização de meu estágio de Doutorando em seu hospital e ser co-orientador neste projeto. Pelo acolhimento e hospitalidade sem precedentes. Por disponibilizar o suporte financeiro necessário para a prorrogação da minha permanência no exterior. Pela preocupação constante em saber se “tudo estava indo bem” comigo.

Ao Dr. Ian C. Summerhayes e à Dra Kimberly M. Rieger-Christ. É muito difícil transformar em palavras a gratidão que tenho por vocês. Por terem me recebido de braços abertos no seu laboratório, pela paciência infinita em ensinar, pela confiança depositada em mim na execução dos projetos. E, principalmente, por terem nos cuidado, a mim e a minha esposa, como se fôssemos seus próprios filhos.

À minha família, por tudo. Aos meus pais, Antônio e Sandra, pelo exemplo e pela dedicação em me proporcionar a melhor educação possível. À memória de minha avó Jaci, que não pode ter o seu “doutorzinho” ao seu lado no momento que mais precisou.

À minha esposa Andréia, pelo amor e companheirismo. Por ter acreditado que era possível realizarmos este projeto de vida. Pelo exemplo que és como Médica

e Pesquisadora e que eu tenho o privilégio de vivenciar e compartilhar diariamente.

Finalmente, o meu agradecimento à Sociedade Brasileira, que financiou parte deste projeto. Que o seu investimento não tenha sido em vão e que eu possa retribuir ao país a confiança que foi depositada na minha formação acadêmica.

Índice

Introdução.....	7
Epidemiologia.....	7
A Transição Epitélio-Mesenquimal.....	8
O Complexo Caderina-Catenina.....	10
Objetivos.....	18
Bibliografia da Introdução.....	19
Artigo 1 (Em Português).....	22
Identificação e Significado Prognóstico de um Perfil de Expressão da Transição Epitélio-Mesenquimal em Tumores Uroteliais de Bexiga	
Artigo 2.....	52
Prognostic Significance of Altered p120 ^{ctn} Expression in Bladder Cancer	
Artigo 3.....	83
P-Cadherin as a Prognostic Indicator and a Modulator of Migratory Behaviour in Bladder Carcinoma Cells	
Conclusões.....	117

Introdução

Epidemiologia

Os tumores uroteliais de bexiga constituem-se na segunda neoplasia gênero-urinária mais freqüente, com uma incidência estimada em 2007, nos Estados Unidos, de mais de 67.000 novos casos e uma estimativa de mortalidade pela doença, no mesmo período, de aproximadamente 13.500 mortes[1]. Ao diagnóstico inicial, 70% dos tumores estão localizados superficialmente, sem invasão da camada muscular (estágios Ta, Tis, T1), enquanto 25% apresentam-se como doença músculo-invasiva (estágios T2-T4) ou metastática (5%). Os tumores não-músculo-invasivos tendem a recidivar com relativa freqüência (60-70%), progredindo para doença músculo-invasiva em 20 a 30% dos casos[2]. Pacientes com doença em estágio T1 (com invasão da lâmina própria), de alto grau e com a presença de carcinoma *in situ* associado, apresentam uma maior chance de evoluir para doença músculo-invasiva ou metastática durante o seguimento da doença[3].

A progressão do tumor para camadas mais profundas da bexiga aumenta a morbidade, levando à necessidade de realização de tratamentos mais invasivos (p.ex. cistectomia radical), refletindo-se negativamente no prognóstico da doença. Isto é verdade também em outras neoplasias de origem epitelial, onde o processo de invasão, com a quebra da barreira constituída pela membrana

basal, leva à invasão local e ao desenvolvimento de metástases. Por esta razão, há um crescente interesse no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão dos tumores para estágios mais avançados da doença[4].

A Transição Epitélio-Mesenquimal

A transição epitélio-mesenquimal (“epithelial-mesenchymal transition” ou EMT), processo no qual há uma troca do fenótipo epitelial das células tumorais para um fenótipo mesenquimal, é um dos possíveis mecanismos envolvidos na disseminação de células carcinomatosas além do sítio inicial da doença[5].

O epitélio caracteriza-se por um conjunto de células fortemente aderidas lateralmente por junções célula-célula, formando uma fina camada celular. Esta camada é polarizada, sendo que ápice e base da célula apresentam propriedades diferentes. Todas as células apresentam a mesma polaridade ápico-basal e sua superfície basal encontra-se situada sobre uma matriz extracelular especializada, a lâmina basal. As junções célula-célula são mediadas por uma série de proteínas, entre elas membros do complexo caderina-catenina, responsáveis pela junção aderente na borda lateral da célula[6].

Por outro lado, as células mesênquimais formam uma rede tecidual difusa, onde a camada celular não é completa e a superfície da célula está conectada às células vizinhas somente por alguns pontos de contato. A matriz extracelular,

formada por colágeno e fibronectina, apresenta-se, diferentemente da lâmina basal, como uma rede com vários pontos de adesão às células. Não há polarização ápico-basal no citoesqueleto[7].

Portanto, a perda por parte das células epiteliais da polaridade ápico-basal, da integridade da lâmina basal e da forte adesão entre as células, ao mesmo tempo em que há a aquisição de propriedades relacionadas à plasticidade e motilidade celular, são marcas registradas da transição epitélio-mesenquimal.

A transição epitélio-mesenquimal foi primeiro observada no processo de desenvolvimento embrionário normal, onde as células epiteliais passam por vários processos de remodelamento, como intercalação, invaginação, evaginação, ramificação e formação de múltiplas camadas celulares. Este processo é importante, por exemplo, para a formação das três camadas do embrião durante a fase de gastrulação. O processo inverso, a transição mesênquima-epitelial, também pode ocorrer nesta fase[8].

Apesar de controverso e não completamente entendido[9], existem evidências *in vitro* de que este fenômeno também é observado durante o processo de tumorigênese, onde a modificação fenotípica das células carcinomatosas facilitaria a quebra da barreira existente pela adesão entre as células epiteliais e entre as células e a membrana basal, conseqüentemente atingindo a região do estroma, o que propiciaria a progressão local do tumor e o desenvolvimento de metástases[10, 11].

Alterações moleculares que ocorrem durante o processo de transição epitélio-mesenquimal e que modificam a expressão, distribuição e função das células

são influenciadas por fatores de crescimento (Transforming Growth Factor β , Epidermal Growth Factor), fatores de transcrição (snail, Smad), moléculas envolvidas na adesão intercelular (caderinas-cateninas) e adesão entre célula e lâmina basal (integrinas), moduladores do citoesqueleto (Rho GTPases) e proteases extracelulares (metaloproteinases matriz). Alterações associadas com o complexo caderina-catenina estão, muito freqüentemente, envolvidas no processo de transição epitélio-mesenquimal, relacionadas à adesão intercelular e aumento da capacidade de migração e invasão das células[7, 8].

O Complexo Caderina-Catenina

As caderinas formam uma superfamília de glicoproteínas transmembrana responsáveis pela adesão intercelular. Existem mais de 30 caderinas identificadas, sendo a E-, P - e N-caderina as primeiras a serem descobertas e estudadas. Juntamente com a R-caderina, formam as caderinas clássicas do tipo I[12]. As caderinas clássicas são moléculas de adesão intercelular cálcio-dependente que interagem de uma maneira homofílica, isto é, caderinas de um mesmo tipo ligam-se somente entre elas. Outros membros da superfamília das caderinas incluem as caderinas desmossômicas (desmogleínas e desmocolinas) que estão associadas com a rede filamentar de queratina. Estas caderinas apresentam uma região extracelular, uma região transmembrana e uma região citoplasmática ou intracelular. Estruturalmente, a região extracelular forma dímeros laterais na superfície celular que interagem com dímeros da célula

oposta, criando uma estrutura semelhante a um zíper[13]. No domínio citoplasmático, as caderinas ligam-se a proteínas chamadas cateninas (γ -catenina ou placoglobina, β -catenina e p120-catenina)[14, 15], formando complexos com estas moléculas. As cateninas estão ligadas à estrutura do citoesqueleto (actina) e a integridade deste complexo é fundamental para a manutenção da função de adesão intercelular e a estrutura do epitélio. A perda de qualquer uma das moléculas que integram o complexo caderina-catenina pode levar à quebra desta estrutura e, conseqüentemente, facilitar a ocorrência da transição epitélio-mesenquimal em um determinado sítio[16]. A perda da expressão ou a translocação da E-caderina ou P-caderina associada ao surgimento da N-caderina (não expressa normalmente no tecido epitelial) e a perda de expressão e/ou translocação das moléculas de catenina são identificadas como eventos envolvidos na transição epitélio-mesenquimal[17, 18].

A E-caderina é reconhecida como a principal molécula responsável pela adesão celular e a sua expressão está, muito freqüentemente, diminuída em células epiteliais transformadas e em células derivadas de carcinomas, correlacionando-se com a perda de diferenciação e aumento da capacidade invasora em modelos experimentais *in vitro*. A supressão da E-caderina leva a indução de invasão em linhagens celulares epiteliais não-invasivas, bem como, a expressão forçada da E-caderina por transfecção de DNA complementar em linhagens celulares sem a presença de E-caderina, a um bloqueio no potencial de invasão destas células[13]. A perda da expressão de E-caderina parece estar fortemente

envolvida com a transição epitélio-mesenquimal e seu papel tem sido bem documentado na manutenção das junções aderentes, possuindo propriedades anti-invasiva e anti-metastática. A produção de E-caderina está mantida na maioria dos tumores, como mama, pulmão, fígado, cólon e próstata, mas os níveis de expressão estão inversamente correlacionados com o grau do tumor e sobrevida dos pacientes[8]. Esta perda da expressão ocorre por diversos mecanismos epigenéticos, tais como repressão da transcrição e promoção da hipermetilação. Ocasionalmente, há mutação do gene da E-caderina levando à ausência de expressão ou uma expressão não funcionante da proteína.

A Placoglobina não está somente associada com as caderinas, mas também existe como parte integral do complexo desmossômico. A diminuição da expressão de desmogleínas e desmocolinas, proteínas que compõem o desmossomo, reduz a expressão de placoglobina em linhagens celulares de tumores vesicais. A mesma ocorrência foi identificada em biópsias de tumores vesicais, juntamente com a ausência de expressão de outros membros do complexo caderina-catenina – β -catenina, α -catenina e E-caderina[19, 20]. Estas alterações foram observadas em outros tipos de neoplasia, incluindo tumores epidermóides de cabeça e pescoço e melanomas[23,24].

Outro evento significativo observado na transição epitélio-mesenquimal e o complexo caderina-catenina é a inibição da expressão da E-caderina com a expressão aberrante da N-caderina nas células epiteliais. A N-caderina tipicamente forma as junções aderentes no tecido nervoso e conjuntivo, sendo que a força de adesão entre as células, propiciada por esta molécula, é

significativamente mais fraca quando comparada à força de adesão entre moléculas de E-caderina nas células epiteliais[6]. Esta “troca” entre as caderinas, com a aquisição de um fenótipo mesenquimal, tem sido documentada em diferentes tipos de neoplasia como outra marca registrada de eventos relacionados à transição epitélio-mesenquimal[18, 21]. Experimentos *in vitro* em células epiteliais também demonstraram que a expressão de N-caderina, independentemente dos níveis de E-caderina, pode induzir a transição epitélio-mesenquimal através do aumento da capacidade migratória das células[17].

A Vimentina é um filamento intermediário mesenquimal e, juntamente com a N-caderina, constitui-se em um dos marcadores mesenquimais da transição epitélio-mesenquimal. A expressão aumentada de Vimentina em células epiteliais está relacionada com aumento da motilidade celular e capacidade de invasão em diferentes tecidos[22, 23].

Ainda sem um papel bem estabelecido, a P-caderina também parece estar envolvida no processo de carcinogênese. A expressão aumentada de P-caderina em linhagens celulares de tumores de mama e pâncreas correlacionou-se com o aumento da capacidade de migração e invasão destas células[24, 25].

Por outro lado, a restauração da P-caderina em linhagens celulares de melanoma reduziu o potencial invasor das células[26]. Em experimentos *in vivo*, analisando tecidos neoplásicos, a expressão aumentada ou diminuída da P-caderina foi correlacionada com fatores clínicos de pior prognóstico[27, 28].

A β -catenina, assim como a placoglobina (γ -catenina), tem a função de ligar-se à α -catenina que se liga à actina no citoesqueleto. Portanto, a β -catenina,

estabiliza o complexo caderina-catenina e a sua perda também está relacionada a eventos relacionados à transição epitélio-mesenquimal. Além de sua função no complexo caderina-catenina, a β -catenina possui um papel de regulação na transcrição gênica dependente da ativação da via de sinalização Wnt, via envolvida nos processos de embriogênese e tumorigênese[13]. Em situação fisiológica, quando ocorre o desprendimento da β -catenina do complexo caderina-catenina e sua disponibilização no citoplasma, a proteína é rapidamente degradada por um complexo multimolecular onde estão incluídos o gene supressor tumoral APC (adenomatous poliposi coli) e o GSK3 β (glicogênio sintase kinase 3 β) que fosforila a β -catenina, evitando o seu acúmulo no citosol. Quando a via Wnt está ativada, há uma inibição da degradação da β -catenina, ocorrendo acúmulo desta proteína no citoplasma e núcleo, aonde a β -catenina vai se complexar a proteínas da família do fator celular T (TCF), responsável pela transcrição gênica[14]. Desta maneira, tanto a perda da expressão da β -catenina na membrana celular, quanto o seu acúmulo no citoplasma e núcleo têm sido relacionadas à carcinogênese em diferentes tumores de origem epitelial[29-31].

De maneira semelhante, porém ainda não tão esclarecida, a p120-catenina também apresenta uma função primordial de estabilização do complexo caderina-catenina, também desempenhando outros papéis quando presente no citoplasma e núcleo. A β -catenina e a Placoglobina interagem fortemente com as caderinas e fazem, quase que exclusivamente, a conexão do complexo com o citoesqueleto de actina. A p120-catenina liga-se às caderinas, em especial à E-

caderina, estabilizando o complexo e controlando a quantidade de caderinas que se agrupam no domínio justamembrana[32, 33]. A p120-catenina é um fator determinante neste processo. A observação de que a introdução desta catenina em linhagens celulares que constitucionalmente a expressam de maneira deficiente aumenta a concentração de E-caderina nas células, recuperando a morfologia epitelial das mesmas, corrobora este fato[34]. A dinâmica deste processo mostra que a p120-catenina não somente regula a estabilidade do complexo caderina-catenina, como a sua ausência determina a internalização/endocitose das caderinas, aumentando a concentração destas proteínas no citoplasma e seu envolvimento nos eventos relacionados à transição epitélio-mesenquimal. De maneira oposta, acredita-se que a p120-catenina tenha a propriedade de reassociar-se às caderinas no citoplasma, trazendo-as novamente à superfície celular[32].

Similarmente à β -catenina, a p120-catenina apresenta funções regulatórias, uma vez que a proteína esteja desligada do complexo caderina-catenina. Por exemplo, a interação com elementos dos microtúbulos, de receptores do fator de crescimento epidérmico e Rho GTPases estão ligados ao aumento da motilidade celular[15]. Ainda não bem elucidada está a participação da p120-catenina como fator regulador da transcrição através de sua ligação com o fator Kaiso no núcleo[35]. A expressão aberrante ou diminuída da p120-catenina, bem como a sua delocalização para a região do citoplasma/núcleo está correlacionada com diversos tumores de origem epitelial bem como fatores de pior prognóstico, como grau de diferenciação tumoral e sobrevida[36].

A redução ou perda da expressão da E-caderina é reconhecida como um importante evento na carcinogênese dos tumores uroteliais[20, 37-39], mais especificamente de bexiga, onde a perda ou redução dos níveis de E-caderina, juntamente com a perda da expressão de Placoglobina e P-caderina, e o surgimento da expressão de N-caderina estão relacionadas ao aumento de motilidade e invasão em linhagens celulares de tumores de bexiga[12, 39-41].

Achados semelhantes foram descritos envolvendo E-caderina e β -catenina em amostras de tumores vesicais. A localização nuclear da β -catenina, secundárias à mutação no seu gene, com conseqüente hiperexpressão de oncogenes c-myc and ciclina D1, também foi descrita como fator associado com tumores vesicais mais agressivos[42].

Outro membro das cateninas, a p120-catenina também está envolvida com eventos ligados à progressão dos tumores de bexiga. Em um estudo experimental *in vivo*, a perda de expressão na membrana celular de p120-catenina e E-caderina correlacionaram-se com estágio e grau tumorais mais avançados, bem como com pior sobrevida[43].

Conforme descrito acima, existem fortes evidências *in vitro* e *in vivo* de que os eventos relacionados à transição epitélio-mesenquimal, mais especificamente àqueles ligados às proteínas do complexo caderina-catenina, estão envolvidos no processo de carcinogênese, sendo determinantes nos estágios de invasão e metastatização dos tumores epiteliais, onde os tumores do urotélio também estão incluídos. Estes eventos, identificados isoladamente ou em um painel de marcadores, podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica ou prognostica,

podendo determinar aqueles tumores com potencial maior de progressão; bem como a identificação de vias moleculares envolvidas neste processo e que possam ser ativadas ou inibidas através de drogas sintetizadas para estes alvos específicos. Primeiramente, estes achados devem ser analisados em grupos maiores de pacientes, com diferentes estágios da doença para que se possa avaliar a real aplicabilidade clínica e a sua potencial utilização para diagnóstico, prognóstico e terapêutica.

Objetivos

Objetivo Principal

Avaliar a expressão de proteínas que compõem o complexo caderina-catenina em amostras de tumores uroteliais de bexiga e identificar o potencial valor prognóstico destes marcadores utilizando uma plataforma de microarranjos de tecidos.

Objetivo Secundário

Avaliar a influência da expressão destas proteínas na motilidade e invasão celular em linhagens celulares de tumores de bexiga.

Bibliografia da Introdução

- [1] American Cancer Society: Facts and Figures. 2007 [cited 2007 07/19/2007]; Available from:
http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2007.asp
- [2] Parekh DJ, Bochner BH, Dalbagni G. Superficial and muscle-invasive bladder cancer: principles of management for outcomes assessments. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 10;24(35):5519-27.
- [3] Stein JP, Penson DF. Invasive T1 bladder cancer: indications and rationale for radical cystectomy. *BJU international*. 2008 Aug;102(3):270-5.
- [4] Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(12):2153-60.
- [5] Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *Journal of cellular biochemistry*. 2007 Jul 1;101(4):816-29.
- [6] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*. 2006 Mar 27;172(7):973-81.
- [7] Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer research*. 2005 Jul 15;65(14):5991-5; discussion 5.
- [8] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews*. 2002 Jun;2(6):442-54.
- [9] Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer research*. 2005 Jul 15;65(14):5996-6000; discussion -1.
- [10] Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*. 2005 Oct;17(5):548-58.
- [11] Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer research*. 2006 Sep 1;66(17):8319-26.
- [12] Rieger-Christ KM, Cain JW, Braasch JW, Dugan JM, Silverman ML, Bouyounes B, et al. Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. *Human pathology*. 2001 Jan;32(1):18-23.
- [13] Behrens J. Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer metastasis reviews*. 1999;18(1):15-30.
- [14] Zhurinsky J, Shtutman M, Ben-Ze'ev A. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *Journal of cell science*. 2000 Sep;113 (Pt 18):3127-39.
- [15] Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7947-56.
- [16] Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*. 2001 Oct;23(10):912-23.
- [17] Gloushankova NA. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry*. 2008 Jul;73(7):742-50.

- [18] Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 1;13(23):7003-11.
- [19] Rieger-Christ KM, Ng L, Hanley RS, Durrani O, Ma H, Yee AS, et al. Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. *British journal of cancer.* 2005 Jun 20;92(12):2153-9.
- [20] Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CF, Akaza H, Koiso K, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer research.* 1996 Sep 15;56(18):4154-8.
- [21] Rieger-Christ KM, Lee P, Zaghera R, Kosakowski M, Moinzadeh A, Stoffel J, et al. Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene.* 2004 Jun 10;23(27):4745-53.
- [22] Gilles C, Polette M, Mestdagt M, Nawrocki-Raby B, Ruggeri P, Birembaut P, et al. Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer research.* 2003 May 15;63(10):2658-64.
- [23] Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Bryden AA, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *The Prostate.* 2002 Sep 1;52(4):253-63.
- [24] Paredes J, Stove C, Stove V, Milanezi F, Van Marck V, Derycke L, et al. P-cadherin is up-regulated by the antiestrogen ICI 182,780 and promotes invasion of human breast cancer cells. *Cancer research.* 2004 Nov 15;64(22):8309-17.
- [25] Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, et al. Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases. *Cancer research.* 2005 Apr 15;65(8):3092-9.
- [26] Van Marck V, Stove C, Van Den Bossche K, Stove V, Paredes J, Vander Haeghen Y, et al. P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma. *Cancer research.* 2005 Oct 1;65(19):8774-83.
- [27] Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Apr 1;22(7):1242-52.
- [28] Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Mathew A, Vijayalekshmi NR, et al. Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. *Mod Pathol.* 2001 May;14(5):423-7.
- [29] Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001 Aug 28;98(18):10356-61.
- [30] Cavard C, Colnot S, Audard V, Benhamouche S, Finzi L, Torre C, et al. Wnt/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma pathogenesis and liver physiology. *Future oncology (London, England).* 2008 Oct;4(5):647-60.
- [31] Huang CL, Liu D, Ishikawa S, Nakashima T, Nakashima N, Yokomise H, et al. Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2008 Sep 12.

- [32] Xiao K, Oas RG, Chiasson CM, Kowalczyk AP. Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochimica et biophysica acta*. 2007 Jan;1773(1):8-16.
- [33] Ohkubo T, Ozawa M. p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jul 23;274(30):21409-15.
- [34] Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, Mariner DJ, Barnes K, Thoreson MA, et al. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of cell biology*. 2002 Nov 11;159(3):465-76.
- [35] Daniel JM. Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochimica et biophysica acta*. 2007 Jan;1773(1):59-68.
- [36] van Hengel J, van Roy F. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochimica et biophysica acta*. 2007 Jan;1773(1):78-88.
- [37] Garcia del Muro X, Torregrosa A, Munoz J, Castellsague X, Condom E, Vignes F, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer*. 2000 Feb;36(3):357-62.
- [38] Mialhe A, Louis J, Montlevier S, Peoch M, Pasquier D, Bosson JL, et al. Expression of E-cadherin and alpha-,beta- and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invasion & metastasis*. 1997;17(3):124-37.
- [39] Nakopoulou L, Zervas A, Gakiopoulou-Givalou H, Constantinides C, Doumanis G, Davaris P, et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, P120ctn in patients with transitional cell bladder cancer. *Anticancer research*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4571-8.
- [40] Gee J GP, Little AF, Libertino JA, Summerhayes IC. Aberrant cadherin expression in bladder carcinoma cell lines. *Molecular Urology*. 1998;2:73-81.
- [41] Girolodi LA, Bringuier PP, Shimazui T, Jansen K, Schalken JA. Changes in cadherin-catenin complexes in the progression of human bladder carcinoma. *International journal of cancer*. 1999 Jul 2;82(1):70-6.
- [42] Shiina H, Igawa M, Shigeno K, Terashima M, Deguchi M, Yamanaka M, et al. Beta-catenin mutations correlate with over expression of C-myc and cyclin D1 Genes in bladder cancer. *The Journal of urology*. 2002 Nov;168(5):2220-6.
- [43] Syrigos KN, Karayiannakis A, Syrigou EI, Harrington K, Pignatelli M. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *Eur J Cancer*. 1998 Dec;34(13):2037-40.

Artigo 1 – Em português

Identificação e Significado Prognóstico de um Perfil de Expressão da Transição Epitélio-Mesenquimal em Tumores Uroteliais de Bexiga

Egbert Baumgart², Michael S. Cohen², Brasil Silva Neto^{1,2}, Micah A. Jacobs², Chad Wotkowicz², Kimberly M. Rieger-Christ^{1,2}, Andreia Biolo⁴, Ron Zeheb³, Massimo Loda⁵, John A. Libertino² e Ian C. Summerhayes^{1,2}

¹Cell and Molecular Biology Laboratory, Robert E. Wise MD Research and Education Institute;

Departments of ²Urology and ³Pathology, Lahey Clinic, Burlington, Massachusetts;

⁴Departamento de Medicina Interna e Cardiologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil;

⁵Department of Pathology, Dana-Farber Cancer Center, Boston, Massachusetts.

Resumo

Introdução e Objetivo: A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é descrita como um evento importante na progressão do câncer, na qual alterações celulares subjacentes têm sido identificadas, principalmente em modelos in vitro. Neste estudo, nós examinamos o padrão de expressão de marcadores da EMT in vivo e determinamos a ocorrência e o significado clínico destes eventos em uma série de carcinomas de bexiga.

Materiais e Métodos: Oitocentos e vinte e cinco amostras de tumores de 572 pacientes foram dispostas em 10 microarranjos de tecidos. Cortes de cada microarranjo de tecidos foram submetidos à recuperação antigênica e analisados através de imunohistoquímica com relação à expressão de E-caderina, Placoglobina, β -catenina, N-caderina e Vimentina.

Resultados: Expressão anormal de E-caderina, β -catenina, Placoglobina e Vimentina associaram-se com as variáveis clínico-patológicas estágio e grau do tumor, onde somente a localização citoplasmática de Placoglobina associou-se com doença linfonodal. Correlações entre os marcadores acima mencionados foi estatisticamente significativa através do Coeficiente de Correlação de Spearman, onde a expressão de N-caderina foi a única a não associar-se com nenhum dos outros marcadores estudados. Na análise de sobrevida univariada, envolvendo pacientes que foram submetidos à cistectomia radical, a redução ou perda da Placoglobina significativamente influenciou a sobrevida global ($p=0,02$) onde o tempo mediano para o desfecho foi de 2 anos, comparado com 4 anos de sobrevida quando um nível normal de Placoglobina foi observado. Quando a

análise foi feita considerando sobrevida câncer-específica, baixos níveis, tanto de Placoglobina ($p=0,02$) quanto de β -catenina ($p=0,02$), influenciaram significativamente o desfecho.

Conclusão: Os supostos marcadores da EMT, definidos dentro de um painel de linhagens celulares de tumores uroteliais de bexiga, foram analisados *in vivo* e estão frequentemente associados com tumores de alto grau e estágios mais avançados da doença. Embora a análise multivariada de sobrevida não mostrou uma influência dos marcadores de adesão celular na sobrevida, alterações associadas com a Placoglobina foram identificadas como um fator prognóstico nestes tumores.

Introdução:

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um processo que foi primeiramente observado no período de desenvolvimento embrionário[1-3] e, mais recentemente, tem sido envolvido como um evento ligado à progressão neoplásica[4-7].

Atualmente, a definição e a ocorrência da EMT em tumores *in vivo* são controversas[6,8]. Contudo, a idéia conceitual de perda de marcadores epiteliais e ganho de marcadores mesenquimais vêm sendo relatada em diversos tipos de neoplasias[9-11] e identificada em diversas linhagens celulares tumorais representativas de diferentes estágios e graus de diferenciação[10,12]. Desta forma, o modelo experimental de progressão descontinuada, observada em um painel de linhagens celulares de um mesmo tecido de origem, pode estar intimamente ligado ao status de diferenciação celular. Na maioria dos casos, a transição projetada entre fenótipos epiteliais e mesenquimais está acompanhada por um aumento na motilidade e capacidade de invasão das células.

Com o advento do estabelecimento de modelos *in vitro* de EMT, causados pela ação de diferentes fatores em tipos celulares alternativos[13-18], a existência da EMT na progressão neoplásica tornou-se mais evidente. Além disso, estes modelos nos possibilitaram confirmar os eventos ligados à EMT identificados previamente no modelo descontinuado e descobrir novos eventos moleculares envolvidos nesta transição[7,19]. Alterações associadas com o complexo caderina-catenina são eventos centrais da transição epitélio-mesenquimal, também relacionados com o aumento de migração e invasão celular[19]. Estes

eventos vão seguir diferentes cursos em diferentes modelos, dependendo do perfil de expressão das caderinas na célula estudada. Em um modelo descontinuado de EMT em câncer de bexiga, nós identificamos a perda ou a expressão diminuída da E-caderina, acompanhada pelo silenciamento da expressão de Placoglobina em eventos relacionados a estágios mais avançados do tumor[20]. Estas alterações estavam ligadas a um aumento de motilidade e invasão em células de tumores uroteliais. Nestas linhagens celulares, a perda de E-caderina está acompanhada do aparecimento da expressão da N-caderina, representando uma troca entre a expressão de caderina clássica do tipo epitelial, para uma caderina mesênquima-específica[21]. Estes eventos também se relacionam com o aumento da capacidade de motilidade e invasão das células. Em um estudo anterior, nós demonstramos a expressão da N-caderina em tumores uroteliais de bexiga[22]. Neste estudo, usando uma plataforma de microarranjos de tecidos, nós avaliamos 5 marcadores de adesão celular ligados à EMT, para determinar a ocorrência da expressão destas moléculas *in vivo* e o potencial valor prognóstico destes eventos dentro de uma série de carcinomas uroteliais de bexiga.

Materiais e Métodos:

Cultura celular: Linhagens celulares de tumores uroteliais de bexiga RT4, RT112, HU456, BC16-1, CUBIII, 5637, PSI, HT1197, HT1376, ScaBER, EJ, KK47, J82, UM-UC-3 e TCCSUP foram mantidas em DMEM suplementado com FBS 7,5% e penicilina/estreptomicina.

Experimentos de invasão: Foram realizadas utilizando câmaras de Boyden consistindo de filtros de membrana Transwell (tamanho do poro 8- μ m; Corning Costar Corp, Cambridge, MA) inserido em pratos de culturas com 24 poços. A superfície superior da membrana foi coberta com Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) e colocada nos pratos com 24 poços

contendo 600µl de meio de cultura condicionado NIH/3T3 (experimental) ou DMEM puro (controle). Células (1×10^5) foram adicionadas a cada câmara Transwell e permitida a invasão até a superfície inferior da membrana por um período de 24 horas a 37°C. As células que passaram através da membrana foram fixadas em metanol, coradas em violeta cristal e contadas por microscopia.

Imunocitoquímica das linhagens celulares de bexiga: Células foram cultivadas em lâminas de vidro, lavadas com PBS e fixados em formaldeído 3,7% por 15 minutos, à temperatura ambiente. Células foram então lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas em 0,5% Triton X-100 em PBS. Seguindo três enxágües em PBS, células foram coradas com os marcadores de interesse usando os anticorpos listados abaixo. As células foram imunocoradas utilizando sistema automatizado (Autostainer Plus, DAKO Corporation, Carpinteria, CA).

Análise por Western Blot: Células em cultura, subconfluentes, foram lavadas em PBS, lisadas em solução-tampão quente [2 x ESB-0,08 mol/L Tris (pH 6,8); 0,07 mol/L SDS, 10% glicerol, 0,001% azul bromofenol e 1 mmol/L CaCl_2] e homogeneizadas através da passagem da solução por agulha de 26 gauge. Lisados foram avaliados para concentração protéica usando método BSA (Pierce, Rockford, IL). Após a determinação da concentração de proteínas, beta-mercaptoetanol (1%) foi adicionado à cada amostra. As amostras foram fervidas por 5 minutos e colocadas em géis de poliacrilamida de 7,5% e 12,5%. Proteínas foram transferidas por um período de 12 horas para membrana de nitrocelulose. Membranas foram bloqueadas em leite a 10%, em solução de TBS com 0,05% Tween e incubadas com o anticorpo primário por 12 horas a 4°C. Membranas foram lavadas em TBS com 0,05% Tween, 3 vezes por 15 minutos e incubada com anticorpo secundário ligadas com peroxidase de rábano-silvestre por 60 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas conforme descrito acima e reveladas através de kit de quimioluminescência (Amersham, Arlington Heights, IL)

Amostras de tecido: Foram utilizadas amostras de tecido de pacientes diagnosticados com câncer de bexiga na Lahey Clinic Medical Center, entre os anos de 1990 e 2005. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da instituição e todos os pacientes consentiram com o uso do material. Blocos de parafina foram retirados dos arquivos do Departamento de Patologia. O

estágio tumoral foi determinado utilizando a classificação TNM e o grau de diferenciação de acordo com a classificação da OMS.

Construção e Imunohistoquímica dos microarranjos: Oitocentos e vinte e cinco amostras de 572 pacientes foram dispostas em 10 microarranjos. Todos os tumores eram do tipo de células transicionais. Microarranjos de tecidos foram organizados com réplicas de cada amostra e cada controle. Controles incluíam amostras de bexiga normal, próstata, testículo, amígdala, fígado, cerebelo, rim e pulmão. Colocação estratégica dos controles em cada microarranjo possibilitou a orientação durante a avaliação dos resultados. Cada microarranjo consistiu de 400 espécimes (4 réplicas para cada amostra). Múltiplas lâminas foram produzidas (cortes de 4µm) e armazenadas a 4°C na presença de desumidificador, antes da realização da coloração por imunohistoquímica. Lâminas foram deparafinizadas e recuperação de antígeno foi realizada utilizando citrato-tampão (pH 6,0; DAKO). Os anticorpos foram diluídos com solução de diluição específica (DAKO). Imunohistoquímica foi realizada utilizando método automatizado (Autostainer Plus, DAKO), usando sistema de detecção de alta sensibilidade baseado em polímero (EnVision, DAKO). Um controle negativo foi incluído, utilizando anticorpo de camundongo (DAKO), substituindo o anticorpo primário.

Anticorpos: Anticorpos monoclonais de camundongo para citoqueratina, E-caderina (DAKO), β -catenina e placoglobina (BD Transduction Laboratories, San Diego, CA) foram diluídos 1:25, 1:100 e 1:100 (concentrações de trabalho de 0,75, 7,56 e 2,5 µg/ml), respectivamente, para uso em imunohistoquímica. Anticorpos monoclonais de camundongo para marcadores mesenquimais N-caderina (Zymed, San Francisco, CA) e Vimentina (DAKO) foram diluídos 1: 100 (5 µg/ml) e 1: 50 (4,6 µg/ml), respectivamente. O controle negativo (DAKO) foi um coquetel pré-diluído de imunoglobulinas não imunes de camundongo (IgG e IgM). A especificidade de cada anticorpo em imunohistoquímica foi determinada utilizando cortes de xenoinxerto derivados de linhagens celulares de tumores de bexiga, nos quais o perfil de expressão do antígeno de interesse foi previamente identificado.

Escore da Imunohistoquímica: As amostras foram pontuadas semiquantitativamente, de acordo com a intensidade da coloração (0 a 3) e localização da proteína (membrana,

citoplasma e núcleo). Nas amostras de tecido vesical normal, a coloração com todos os anticorpos receberam escore 3, localizados na membrana celular através de toda a extensão da camada epitelial da mucosa. Em cortes onde a coloração era heterogênea por toda a amostra ou entre amostras de um mesmo tumor, o escore que traduzia o pior cenário foi atribuído quando mais de 5% das células apresentavam aquele fenótipo. Mais de 90% de concordância entre réplicas de um mesmo tumor foi observada. Amostras com completa ausência de coloração ou coloração muito fraca em <5% das células, receberam escore 0. No caso da N-caderina e da Vimentina, um escore positivo ou negativo foi atribuído para cada amostra, já que a presença de marcadores mesênquimais representaria o evento de interesse. Cada microarranjo foi pontuado independentemente (ICS e ML). Quando os escores foram discordantes, ambos revisaram as amostras até a obtenção de consenso.

Análise Estatística: Comparação entre grupos foi realizada pelo teste de qui-quadrado. Correlação entre marcadores foi determinada pelo coeficiente de correlação de Spearman. Análise de sobrevida global e câncer-específica univariada foram realizadas utilizando o método de Kaplan-Meier, com a cirurgia como data de entrada. O teste de log-rank (Cox-Mantel) foi usado para comparar curvas de sobrevida em diferentes categorias de cada variável. Variáveis com efeito na sobrevida na análise univariada ($p \leq 0,15$) foram examinadas por log-log plot para determinar como estas variáveis poderiam ser incorporadas em um modelo de regressão proporcional de Cox e variáveis com $p \leq 0,1$ foram mantidas no modelo. Testes de interação foram realizados com variáveis que foram consideradas significativas na análise de regressão de Cox. Dados foram analisados usando o software SPSS, versão 11.5. Silva Neto B e Biolo A realizaram a análise estatística.

Resultados:

Caracterização dos marcadores de transição epitélio-mesenquimal nas linhagens celulares – Para estabelecer a suposta ocorrência de um fenótipo característico da transição epitélio-mesenquimal em tumores de bexiga, nós inicialmente analisamos um painel de 15 linhagens celulares para expressão

dos 5 marcadores em estudo. A tabela 1 mostra o perfil de expressão de cada componente, determinado em Western Blot e a análise morfológica e de invasão *in vitro* de cada linhagem. Não foi observada a localização nuclear de proteínas por imunocitoquímica. Classificação morfológica de células epiteliais foi definida por células cuboidais, intimamente aderidas, enquanto a morfologia mesenquimal foi definida como células fracamente aderidas, mostrando uma morfologia estrelada.

Fenótipo da EMT em amostras teciduais de tumores de bexiga – Se o fenótipo identificado no painel de linhagens celulares é um paradigma válido em câncer de bexiga, nós esperaríamos ver as alterações sugeridas nos marcadores epiteliais e mesenquimais associadas com doença mais agressiva. Para testar esta hipótese, os níveis de expressão e localização de E-caderina, placoglobina, β -catenina, N-caderina e Vimentina foram analisados em microarranjos de tumores uroteliais de bexiga. A construção dos 10 microarranjos incluiu 825 amostras de tumores de 572 pacientes. A classificação TNM e grau histológico são mostrados na tabela 2. Análise por pacientes ao invés de por amostras não mostrou diferença nos resultados. Neste estudo, a análise do grupo de tumores superficiais incluiu pTa, pTis e pT1, enquanto o grupo de tumores músculo-invasivos incluiu estágios pT2-pT4. Quando os tumores pT1G3 foram incluídos no grupo de tumores invasivos, não foi observada mudança nos resultados (dados não mostrados).

Expressão de E-caderina – Uma redução ou perda da expressão de E-caderina correlacionou-se significativamente com estágio tumoral ($p < 0,001$),

grau histológico ($p < 0,001$), mas não com envolvimento linfonodal ou invasão linfovascular na amostra. Perda ou redução na expressão de E-caderina foi observada em 37,7% dos tumores superficiais e 60,2% dos tumores invasivos, com valores semelhantes registrados para localização citoplasmática da E-caderina, 26% e 58,1%, respectivamente (tabela 3).

Expressão de β -catenina – Uma redução ou perda da expressão, além da expressão citoplasmática da β -catenina, mostrou correlação significativa com estágio e grau do tumor ($p < 0,001$). Intensidade e localização não se associaram com status linfonodal e invasão linfovascular (tabela 3). A redução ou perda da expressão de β -catenina foi observada em 16,7% dos tumores superficiais e 47,6% dos tumores invasivos (tabela 3). A localização citoplasmática de β -catenina mostrou uma grande diferença entre os grupos superficial e invasivo, 17,9% e 58%, respectivamente. Localização nuclear da β -catenina foi registrada em 27 de 709 (3,8%) amostras de tumores vesicais, incluindo 1Ta, 9 T1 e 17 T2-T4.

Expressão de Placoglobina – A redução ou perda da expressão e a localização citoplasmática de placoglobina foram significativamente associadas com estágio e grau da neoplasia ($p < 0,001$). A localização da Placoglobina também se correlacionou com doença linfonodal ($p = 0,04$). Invasão linfovascular não se correlacionou com nenhuma das variáveis imunohistoquímicas. Perda ou redução da expressão da Placoglobina foi observada em 15,2% dos tumores superficiais e 57,9% dos tumores invasivos. Assim como a localização da β -catenina, ocorreu uma importante diferença entre a frequência da localização

citoplasmática de Placoglobina nos grupos de estágio superficial (23,1%) e invasivo (72,1%). Localização nuclear da Placoglobina foi observada em 13 de 726 (1,8%) amostras, incluindo 4 Ta, 4 T1, e 5 T2-T4.

Expressão de N-caderina – O aparecimento da expressão de N-caderina foi observado em 61 de 746 (8,2%) tumores vesicais (figuras 1 A e B), incluindo 32 tumores superficiais e 24 tumores invasivos, com 5 lesões Tx. Expressão de N-caderina na membrana foi raramente vista por toda a extensão do tumor (figura 1B). Ao contrário, foi observada focalmente na lesão (figura 1A). Dos 61 tumores positivos para N-caderina, somente 21 apresentaram coloração para a proteína em todas as 4 réplicas da amostra. A expressão de N-caderina não se correlacionou com nenhuma das variáveis clínicas estudadas.

Expressão de Vimentina – O aparecimento da expressão de Vimentina em amostras de tumores vesicais foi registrado em 143 de um total de 795 (18%) tumores, incluindo 29 superficiais, 97 invasivos e 17 Tx. Expressão de Vimentina (figuras 1 C e D) correlacionou-se significativamente com estágio e grau do tumor ($p < 0,001$), mas não com doença linfonodal e invasão linfovascular. A figura 2 mostra a coloração para todos os marcadores em uma mesma amostra de tecido, demonstrando a co-expressão de queratina e vimentina (figuras 2A e 2E, respectivamente).

Associação entre os marcadores da EMT – Perda ou redução da expressão de E-caderina correlacionou-se significativamente com a baixa expressão de β -catenina ($p < 0,01$; Coeficiente de Spearman = 0,446), baixa expressão de Placoglobina ($p < 0,01$; Coeficiente de Spearman = 0,37) e com a

expressão de Vimentina ($p < 0,01$; Coeficiente de Spearman = $-0,109$). Baixa expressão de β -catenina foi associada com baixa de expressão de Placoglobina ($p < 0,01$; Coeficiente de Spearman = $0,441$) e Vimentina ($p < 0,01$; Coeficiente de Spearman = $-0,181$). A Baixa expressão de Placoglobina e Vimentina positiva também se correlacionaram significativamente ($p < 0,01$; Coeficiente de Spearman = $-0,231$). Nenhum dos marcadores acima mencionados correlacionou-se com a expressão de N-caderina.

Análise de sobrevida – Porque não havia o registro adequado de seguimento para os pacientes do grupo de tumores superficiais, a análise de sobrevida foi restrita ao grupo de pacientes submetidos à cistectomia radical. Análise univariada de sobrevida global, envolvendo cada um dos marcadores em estudo, demonstrou que a redução ou perda de expressão de Placoglobina correlacionou-se estatisticamente com a sobrevida dos pacientes ($p = 0,02$), com uma tendência de associação para β -catenina ($p = 0,11$; Figuras 3A e 3C). Por outro lado, não houve influência na sobrevida dos níveis de expressão de E-caderina ou N-caderina (Figuras 3E e 3G). Dentre deste grupo de pacientes, as variáveis clínicas de estágio tumoral, grau, doença linfonodal e invasão linfovascular mostraram uma correlação estatisticamente significativa com sobrevida global. A sobrevida global em 5 anos para pacientes cujos tumores apresentavam perda ou redução na expressão de Placoglobina foi de 29,4% comparado com 41,5% quando a expressão desta proteína foi normal. Sobrevida em 10 anos foi de 22,9% e 29,2%, respectivamente. O tempo mediano para o desfecho foi de 2 anos para o grupo com baixa expressão de

Placoglobina e de 4 anos para o grupo com expressão normal. A sobrevida em 5 anos para o grupo com perda ou expressão diminuída de β -catenina foi de 29,1% comparado com 40,8% quando a β -catenina tinha expressão normal. Sobrevida em 10 anos foi de 24,2% e 23,5%, respectivamente. O tempo mediano para o desfecho para perda ou redução da expressão de β -catenina foi de 2,4 anos, enquanto que para a expressão normal de β -catenina o tempo foi de 3,8 anos.

Quando o desfecho foi sobrevida câncer-específica, a perda ou redução de Placoglobina ($p=0,02$) e β -catenina ($p=0,02$) foram estatisticamente diferentes quando comparadas com os grupos com expressão normal destes marcadores (Figura 3B e 3D). Como esperado, as variáveis clínico-patológicas correlacionaram-se significativamente com sobrevida câncer-específica. As taxas de sobrevida câncer-específica em 5 e 10 anos foram, respectivamente, de 43,7% e 41% para a perda ou redução de Placoglobina comparado com 55% e 52,7%, respectivamente, no grupo com níveis normais de expressão. Com a β -catenina, sobrevida em 5 e 10 anos foi de 41,9% e 39,4%, respectivamente, para níveis baixos de expressão comparado com 56,3% e 53,7%, respectivamente, para níveis normais de expressão. E-caderina e N-caderina não demonstraram influência na sobrevida câncer-específica (Figura 3F e 3H).

Análise multivariada foi realizada utilizando as variáveis Placoglobina, β -catenina, estágio tumoral, idade e invasão linfovascular, já que todas mostraram significância estatística na análise univariada, conforme descrito nas tabelas 4 e 5. Para sobrevida global, invasão vascular e idade foram os fatores prognósticos

independentes (hazard ratio =1,83; $p<0,001$ e 1,03 a cada ano; $p=0,006$, respectivamente). A perda de Placoglobina (hazard ratio 1,31; $p=0,11$) e β -catenina ($p=0,82$) não se correlacionaram com sobrevida global na análise multivariada.

Para sobrevida câncer-específica, a localização de Placoglobina e β -catenina foram incluídas no modelo de regressão mostrado acima. Invasão linfovascular foi o único fator preditor de sobrevida câncer-específica no modelo de regressão (hazard ratio=2,57; $p< 0,001$).

Discussão:

Neste estudo, nós analisamos a expressão e o valor prognóstico de um painel de 5 marcadores associados com o fenótipo relacionado à transição epitélio-mesenquimal. A perda da expressão de E-caderina e o surgimento da expressão de N-caderina representam características bem definidas da EMT, ambos já descritos em neoplasias vesicais[22,23]. Ligada a esta transição, também está a expressão da proteína de filamento intermediário mesenquimal, a Vimentina, freqüentemente acompanhada da expressão alterada de citoqueratinas[19]. Além disso, a relocalização da β -catenina está implicada no processo de EMT[9]. Vários estudos mostraram que a perda ou redução da expressão de Placoglobina nas células epiteliais ocorre junto com a ausência da expressão de E-caderina. Estas alterações têm sido relacionadas como parte do fenótipo que envolve a EMT[24]. Mudanças na expressão das proteínas acima mencionadas representam um desfecho que pode ser modulado por um crescente número de moléculas envolvidas na regulação de transcrição,

sinalização celular e modulação do microambiente tumoral[para revisão ver refs. 7,14,19,24]. Contudo, ainda há controvérsia sobre a ocorrência destes eventos *in vivo*, já que a observação destas alterações morfológicas é raramente descrita pelos patologistas, ao analisarem tumores primários e lesões secundárias[8].

O contra-argumento para esta afirmação requer necessariamente a demonstração dos eventos relacionados à EMT *in vivo*, durante a progressão tumoral[25,26]. Evidência disto começa a surgir e, atualmente, incluem relatos da presença da proteína Snail1, integrina $\alpha\beta 6$ e a localização nuclear de β -catenina em tumores colônicos invasivos[14,19]. A melhor maneira de analisar estas alterações talvez seja a análise total dos cortes, já que algumas alterações presentes somente na região invasora do tumor podem não ser visualizadas em outras áreas da lesão.

A redução ou perda de expressão da E-caderina é reconhecida como um importante evento primário na carcinogênese dos tumores vesicais, normalmente ligado a um pior prognóstico[23,27-29]. Neste estudo, a expressão alterada de E-caderina correlacionou-se significativamente com a baixa expressão de β -catenina e Placoglobina, juntamente com o aparecimento de expressão da Vimentina. A consideração destas mudanças associadas com as proteínas do complexo caderina-catenina revelou uma diferença estatisticamente significativa entre a frequência destes eventos entre os grupos de tumores superficiais e profundos, ligando os mesmos à progressão tumoral. Embora a expressão ou localização alterada da E-caderina não esteve

associada com envolvimento dos linfonodos ou invasão vascular, a localização citoplasmática da Placoglobina foi um indicador de envolvimento linfonodal.

A localização nuclear da β -catenina e Placoglobina foram observadas em 3,8% e 1,8% dos tumores, respectivamente, e foi sempre observada na presença citoplasmática de um membro das cateninas. A freqüência reportada da localização nuclear da β -catenina em tumores vesicais varia entre 0-22% em estudos com número menor de pacientes[30-33]. Mutações associadas com a β -catenina resultaram em sua localização nuclear em tumores vesicais[30]. Localização nuclear da Placoglobina parece ser um achado menos freqüente e, embora tenha sido descrito em outros tumores[34,35], não há relato prévio de localização nuclear da Placoglobina em tumores de bexiga. A localização nuclear de ambas as proteínas foi observada na maioria das amostras, onde apareciam focalmente, representando <5% da amostra, conseqüentemente não sendo classificadas como tal. Dada a suposta natureza transitória dos eventos relacionados à EMT e a limitada, possivelmente temporária, realocização nuclear das cateninas associadas com a região invasora destas lesões, nós podemos ter subestimado a representação de alguns eventos menores.

A aparição da N-caderina também vem sendo relatada em tumores vesicais em humanos[22] e foi previamente observada em 39% (20/51) dos tumores. Neste estudo de maior magnitude, nós observamos a expressão da N-caderina em apenas 8,2% (61/746) dos tumores vesicais usando o mesmo anticorpo e a mesma técnica de recuperação de antígeno. Consistente com o nosso relato prévio, o surgimento da N-caderina foi focal em todos os microarranjos e,

embora a presença de quatro amostras de um mesmo tecido foi considerada suficiente para representar o padrão de expressão de uma determinada lesão, nós acreditamos que a frequência da expressão de N-caderina está subestimada nesta amostra. Suporte para este achado está na individualização da análise das quatro réplicas de cada lesão. Uma revisão destes resultados revelou a expressão de N-caderina em todas as réplicas de uma amostra específica em um terço dos casos (21/61). É importante observar que não houve diferença na expressão desta proteína entre os grupos superficial e invasivo. Recentemente, foi descrito que a N-caderina é um marcador prognóstico de progressão tumoral em tumores superficiais[36]. Embora nós tenhamos demonstrado previamente que a N-caderina promove invasão celular em tumores de bexiga[37], a expressão de N-caderina em diferentes estágios da doença faz com que o estudo de funções adicionais da N-caderina seja considerado.

O aparecimento da expressão de Vimentina, o segundo marcador mesenquimal relacionado à EMT, foi freqüentemente observado em linhagens celulares derivadas de tumores vesicais que possuem uma morfologia celular com padrão mesenquimal. Contudo, está descrito que as células podem expressar Vimentina após um período em cultura *in vitro*[38]. Neste estudo, nós demonstramos que o surgimento da expressão de Vimentina em tumores epiteliais está correlacionado com lesões vesicais invasivas. Confirmação da origem epitelial destas células foi feita através da análise da expressão de citoqueratinas em células vizinhas, demonstrando a co-expressão destes dois fenótipos. Não se

observou correlação entre os dois marcadores mesenquimais, N-caderina e Vimentina. Enquanto a N-caderina não foi associada com nenhuma das variáveis clínico-patológicas estudadas, a Vimentina correlacionou-se com estágio e grau do tumor. Além disso, a expressão de Vimentina correlacionou-se significativamente com a expressão diminuída de β -catenina e Placoglobina. A expressão de Vimentina foi observada em 18% (143/795) dos tumores vesicais, demonstrando a expressão deste filamento intermediário *in vivo*. É interessante observar que um subgrupo dos tumores superficiais (6,8%) expressava Vimentina. Considerando a associação de Vimentina com tumores mais agressivos, seria importante estabelecer se este subgrupo de tumores estaria sob um maior risco de progredir para doença invasiva, como tem sido descrito para N-caderina[36].

Neste estudo, dados de sobrevida foram avaliados somente em pacientes que foram submetidos à cistectomia radical. Para sobrevida global, a redução ou a perda da Placoglobina foi uma das variáveis que mostrou correlação com o desfecho. Como esperado dentro deste grupo de pacientes, as variáveis clínico-patológicas estágio tumoral, doença linfonodal e invasão vascular também mostraram correlação estatisticamente significativa com sobrevida global. O tempo mediano para o desfecho em pacientes com a expressão diminuída de Placoglobina foi metade (2 anos) daquela registrada no grupo com expressão normal da proteína (4 anos). De fato, um estudo prévio com um pequeno grupo de pacientes com câncer vesical[39] também descreveu que a expressão alterada de Placoglobina influencia na sobrevida. Alterações na expressão da

Placoglobina também foram descritas como um marcador de progressão em tumores vesicais T1[40]. Um padrão similar foi observado para β -catenina, embora estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Quando o desfecho foi limitado à sobrevida câncer-específica, tanto a expressão quanto à localização de Placoglobina e β -catenina tiveram influência no desfecho.

Neste estudo, nós identificamos alterações ligadas à transição epitélio-mesenquimal que ocorrem em tumores uroteliais de bexiga. A perda de E-caderina é um evento bem estabelecido na carcinogênese e, mais recentemente, nós demonstramos o aparecimento da expressão de N-caderina em tumores vesicais em humanos. A ligação da expressão diminuída da Placoglobina com eventos associados à EMT foi descrita mais recentemente. Esta combinação de alterações fenotípicas tem sido observada em todas as linhagens celulares de tumores vesicais que demonstram uma morfologia característica da transição epitélio-mesenquimal, acompanhado pelo aumento da capacidade de migração e invasão das células. Neste estudo, nós demonstramos que a perda da expressão de E-caderina está associada com perda da expressão de Placoglobina, mesmo na presença da expressão de N-caderina. Além disso, a expressão de Vimentina também se correlacionou, de maneira estatisticamente significativa, com alterações na expressão de E-caderina, β -catenina e Placoglobina. A falta de associação da N-caderina com as outras variáveis estudadas surpreende, embora, como previamente discutido, nós acreditamos que tenha havido uma subestimação da frequência de expressão deste marcador. Contudo, nós descrevemos a expressão *in vivo* de

alterações envolvidas com o processo de transição epitélio-mesenquimal em neoplasia urotelial vesical, dentre as quais a expressão reduzida ou ausente de Placoglobina é descrita como fator prognóstico mais importante nestes tumores.

Tabela 1 – Expressão do Fenótipo de Transição Epitélio-Mesenquimal em Linhagens Celulares de Carcinomas Uroteliais de Bexiga

	E-cadherina	Placoglobina *	β-catenina*	N-cadherina	Vimentina	Morfologia	Invasão+
RT4	+++	+++	+++	-	-	E	-
RT112	+++	+++	+++	-	-	E	-
HU456	+++	+++	+++	+	+	E/M	+
BC16.1	+++	+++	+++	+	+	E	-
CUBIII	+++	+++	+++	-	-	E	-
5637	+++	+++	+++	+	+	E	-
PSI	+++	+++	+++	+	-	E	-
HT1197	+++	+++	+++	-	-	E	-
HT1376	+++	+++	+++	-	-	E	-
SCaBER	+++	+++	+++	+	-	E	-
EJ	-	+	++	+	+	M	+
KK47	-	+++	+++	+	+	E/M	+
J82	-	+	++	+	+	M	+++
UM-UC-3	-	+	++	+	+	M	++
TCCSUP	-	+	++	+	-	M	+

+++ = expresso em níveis altos; ++ = expresso em níveis moderados; += expresso em níveis baixos; - = sem expressão detectada; E = morfologia epitelial E/M = morfologia intermediária entre células epiteliais e mesênquimais; M = morfologia mesenquimal.

*Sem evidência de localização nuclear de cateninas foi observada em imunocitoquímica.

*Invasão avaliada após período de 16 horas em experimento *in vitro*. Resultados foram pontuados como número de células que atravessaram a membrana por cada 1mm de área; - = 0 – 4 células; + = 5-20 células; ++ = 21 a 50 células; +++ >50 células.

Tabela 2 – Parâmetros Clínico-Patológicos nas 825 Amostras de Tumores de Células Transicionais de Bexiga

	Amostras (%) n=825	Pacientes (%) n=572	Cistectomias (%) n=299
Estadiamento			
pTa	317(38,4)	211(36,9)	10(3,3)
pTis	40(4,8)	24(4,2)	22(7,4)
pT1	92(11,1)	54(9,4)	32(10,7)
pT2-T4	321(39)	268(46,9)	233(77,9)
pTx	55(6,7)	15(2,6)	2(0,7)
Grau			
1/2	298(36,2)	198(34,6)	27(9)
3	526(63,8)	374(65,8)	272(91)
Estadiamento/Grau			
Ta/G1-G2	248(30,1)	167(29,2)	6(2)
TaG3	69(8,4)	44(7,7)	4(1,3)
T1G2	17(2,1)	11(1,9)	6(2)
T1G3	74(9)	43(7,5)	26(8,7)
T2-T4/G2	25(3)	18(3,1)	15(5)
T2-T4/G3	296(35,9)	250(43,8)	218(72,9)
Tx/G1-G2	7(0,9)	1(0,2)	0
Tx/G3	48(5,8)	14(2,4)	2(0,7)
Estadiamento N/M			
N+ (n=283/262/240)	83(29,3)	78(29,6)	62(25,8)
M+ (n=393/317/270)	33(8,4)	30(9,5)	8(3)
Invasão Vascular – presente* [†] (n=447/325/265)	203(45,4)	166(51,1)	136(51,3)
Sexo – Masculino (n=572/299)		438(76,6)	231(77,3)
Tabagismo – sim (n=543/282)		393(72,4)	209(74,1)
Idade Média na Cistectomia (anos)			67,1±9,7

Valores estão expressos como número de amostras ou pacientes(%) ou média ± DP. *Ta e Tis não foram considerados na análise. Todos os Tis são grau 3.

Tabela 3 – Associações entre os Marcadores da EMT e Fatores Clínicopatológicos em Pacientes com Câncer de Bexiga

	E-caderina baixa exp.	<i>p</i>	β-catenina baixa exp.	<i>p</i>	Placoglobina baixa exp.	<i>p</i>	Vimentina presente	<i>p</i>	N-caderina presente	<i>p</i>
<i>Estadiamento</i>										
Superficial	37,7 (427)	<0,001	16,7 (426)	<0,001	15,2 (429)	<0,001	6,8 (427)	<0,001	8,1 (393)	0,94
Invasivo	60,2 (304)		47,6 (313)		57,9 (309)		30,9 (314)		8,0 (301)	
<i>Grau</i>										
1/2	36 (292)	<0,001	12,5 (289)	<0,001	15 (287)	<0,001	6,2 (292)	<0,001	10,6 (263)	0,07
3	54,3 (490)		40,4 (502)		44,3 (503)		24,7 (502)		6,8 (482)	
<i>Invasão Vascular</i>										
Não	51,9 (231)	0,07	41,1 (236)	0,2	50,2 (233)	0,671	27,5 (236)	0,5	9,2 (228)	0,18
Sim	60,8 (194)		47,2 (199)		52,3 (199)		30,5 (200)		5,7 (193)	
<i>Linfonodos</i>										
Negativo	52,7 (182)	0,19	42,6 (190)	0,14	52,4 (191)	0,218	26,6 (192)	0,4	6,0 (184)	0,14
Positivo	61,5 (78)		52,5 (80)		60,5 (81)		31,7 (82)		11,3 (80)	

Tabela 3 – continuação

	E-caderina citoplasma	<i>p</i>	β-catenina citoplasma	<i>p</i>	Placoglobina citoplasma	<i>p</i>
<i>Estadiamento</i>						
Superficial	26 (358)	<0,001	17,9 (407)	<0,001	23,1 (416)	<0,001
Invasivo	58,1 (172)		58,0 (257)		72,1 (265)	
<i>Grau</i>						
1/2	19,3 (254)	<0,001	13,2 (280)	<0,001	18,5 (281)	<0,001
3	51,3 (308)		47,7 (428)		57,7 (444)	
<i>Invasão Vascular</i>						
Não	51,8 (137)	0,40	53,9 (206)	0,56	62,9 (202)	0,28
Sim	57,1 (112)		57,0 (158)		68,2 (170)	
<i>Linfonodos</i>						
Negativo	49 (98)	0,29	56,9 (160)	0,14	65,0 (160)	0,04
Positivo	59 (39)		67,8 (59)		78,9 (71)	

Valores expressos em porcentagem (número de amostras)

Table 4 - Preditores na Análise Univariada de Sobrevida Global e Câncer-Específica.

	Variável	HR (IC 95%)	p
Sobrevida Global			
	Vascular invasion	1.87 (1.37-2.56)	<0.001
	Age (1-year increment)	1.03 (1.01-1.05)	<0.001
	Sexo (masculino)	0.83 (0.60-1.14)	0.25
	Tabagismo	1.04 (0.74-1.45)	0.82
	Estadiamento (T2-T4)	2.23 (1.50-3.32)	<0.001
	Grau 3	1.21 (0.77-1.91)	0.41
	Linfonodo (+)	1.71 (1.19-2.46)	0.003
	Metástase (+)	2.31(1.08-4.97)	0.03
	Placoglobina (expressão baixa)	1.41 (1.05-1.89)	0.02
	Placoglobina (citoplasma)	1.25 (0.88-1.76)	0.21
	β -catenina (expressão baixa)	1.27 (0.95-1.70)	0.11
	β -catenina (citoplasma)	1.06 (0.76-1.48)	0.75
	E-caderina (expressão baixa)	1.04 (0.77-1.41)	0.78
	E-caderina (citoplasma)	1.08 (0.72-1.59)	0.71
	N-caderina (presente)	0.98 (0.43-2.22)	0.96
	Vimentina (presente)	1.03(0.73-1.46)	0.85
Sobrevida específica	câncer-		
	Invasão Vascular	2.48 (1.68-3.66)	<0.001
	Idade (a cada 1 ano)	1.02 (0.99-1.04)	0.08
	Sexo (masculino)	0.75 (0.51-1.11)	0.16
	Tabagismo	0.96 (0.64-1.44)	0.84
	Estadiamento (T2-T4)	3.35 (1.88-5.96)	<0.001
	Grau 3	1.15 (0.66-2.00)	0.63
	Linfonodo (+)	2.15 (1.42-3.24)	<0.001
	Metástase (+)	3.21(1.40-7.36)	0.06
	Placoglobina (expressão baixa)	1.54 (1.07-2.22)	0.02
	Placoglobina (citoplasma)	1.39 (0.90-2.16)	0.14
	β -catenina (expressão baixa)	1.55 (1.08-2.24)	0.02
	β -catenina (citoplasma)	1.47 (0.95-2.27)	0.08
	E-caderina (expressão baixa)	1.32 (0.90-1.92)	0.16
	E-caderina (citoplasma)	0.93 (0.56-1.52)	0.76
	N-caderina (presente)	1.20 (0.49-2.93)	0.70
	Vimentina (presente)	1.24 (0.80-1.92)	0.37

HR= Hazard-ratio, IC= Intervalo de Confiança.

Tabela 5 - Modelo de Regressão de Cox – Análise de Sobrevida Multivariada

	Variável	HR (IC 95%)	p
Sobrevida Global			
	Invasão Vascular	1.83 (1.31–2.57)	<0.001
	Idade (a cada 1 ano)	1.03 (1.01–1.04)	0.006
	Estadiamento(T2-T4)	1.45 (0.78–2.70)	0.24
	Placoglobina(baixa expressão)	1.31 (0.94–1.85)	0.11
	β -catenina (baixa expressão)	1.03 (0.75–1.44)	0.82
Sobrevida câncer-específica			
	Invasão Vascular	2.57 (1.51–4.35)	<0.001
	Idade (a cada 1 ano)	1.02 (0.99–1.05)	0.14
	Estadiamento(T2-T4)	0.97 (0.40–2.38)	0.95
	Placoglobina(baixa expressão)	1.30 (0.77–2.21)	0.33
	Placoglobina (citoplasma)	1.41 (0.75–2.63)	0.28
	β -catenina (baixa expressão)	1.19 (0.60–2.23)	0.60
	β -catenin (citoplasma)	0.85 (0.42–1.70)	0.65

HR= Hazard-ratio, IC= Intervalo de Confiança

Variáveis inicialmente incluídas no modelo foram: Invasão Vascular, idade, estadiamento, presença de linfonodos positivos ou metástases, expressão de placoglobina, expressão de β -catenina. Localização de Placoglobina e β -catenina foram incluídas somente na análise de sobrevida câncer-específica.

Figura 1

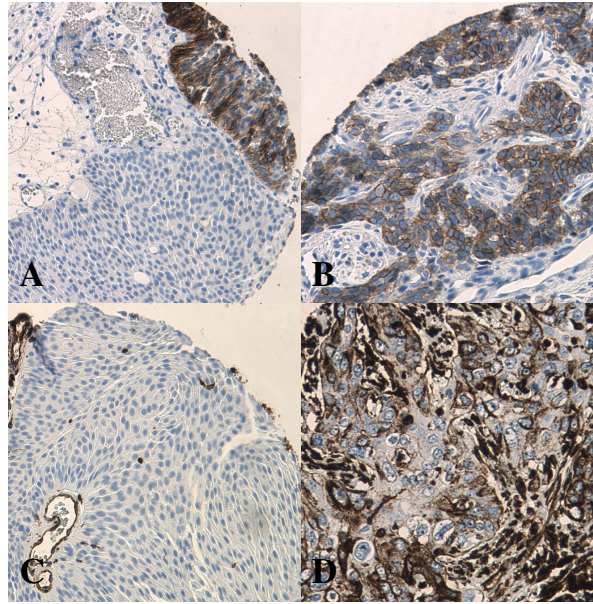


Figura 1 - Imunohistoquímica mostrando N-caderina (A e B) e Vimentina (C e D) em tumores vesicais de baixo (A e C) e alto graus (B e D). A – expressão focal de N-caderina em uma amostra de tumor superficial. B – expressão de N-caderina por toda a extensão da amostra em um tumor invasivo. C – ausência de expressão de Vimentina nas células epiteliais de um tumor superficial. D – expressão de Vimentina nas células de um tumor invasivo.

Figura 2

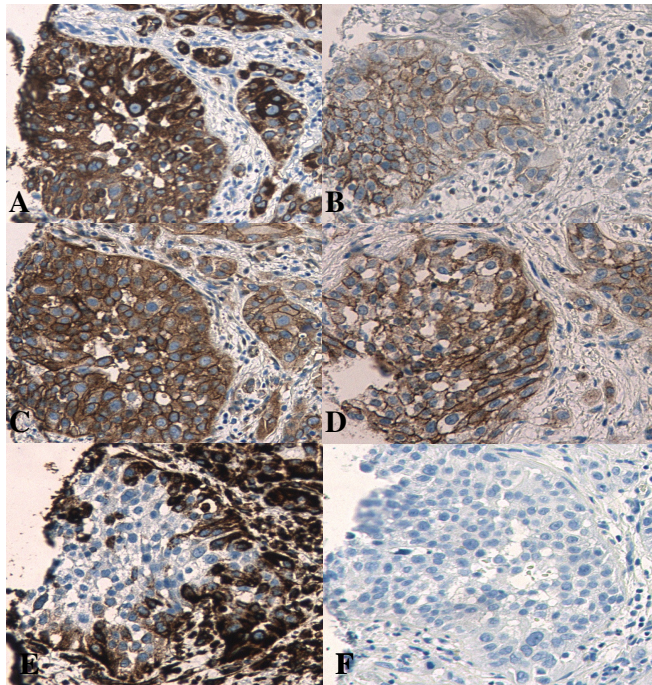


Figura 2 - Imunohistoquímica mostrando uma mesma amostra tumoral sendo corado com anticorpos para (A) Queratina, (B) E-caderina, (C) β -catenina, (D) Placoglobina, (E) Vimentina e (F) N-caderina. Observar a co-expressão de filamentos intermediários de Queratina e Vimentina (comparar A e E) na ausência de expressão de N-caderina.

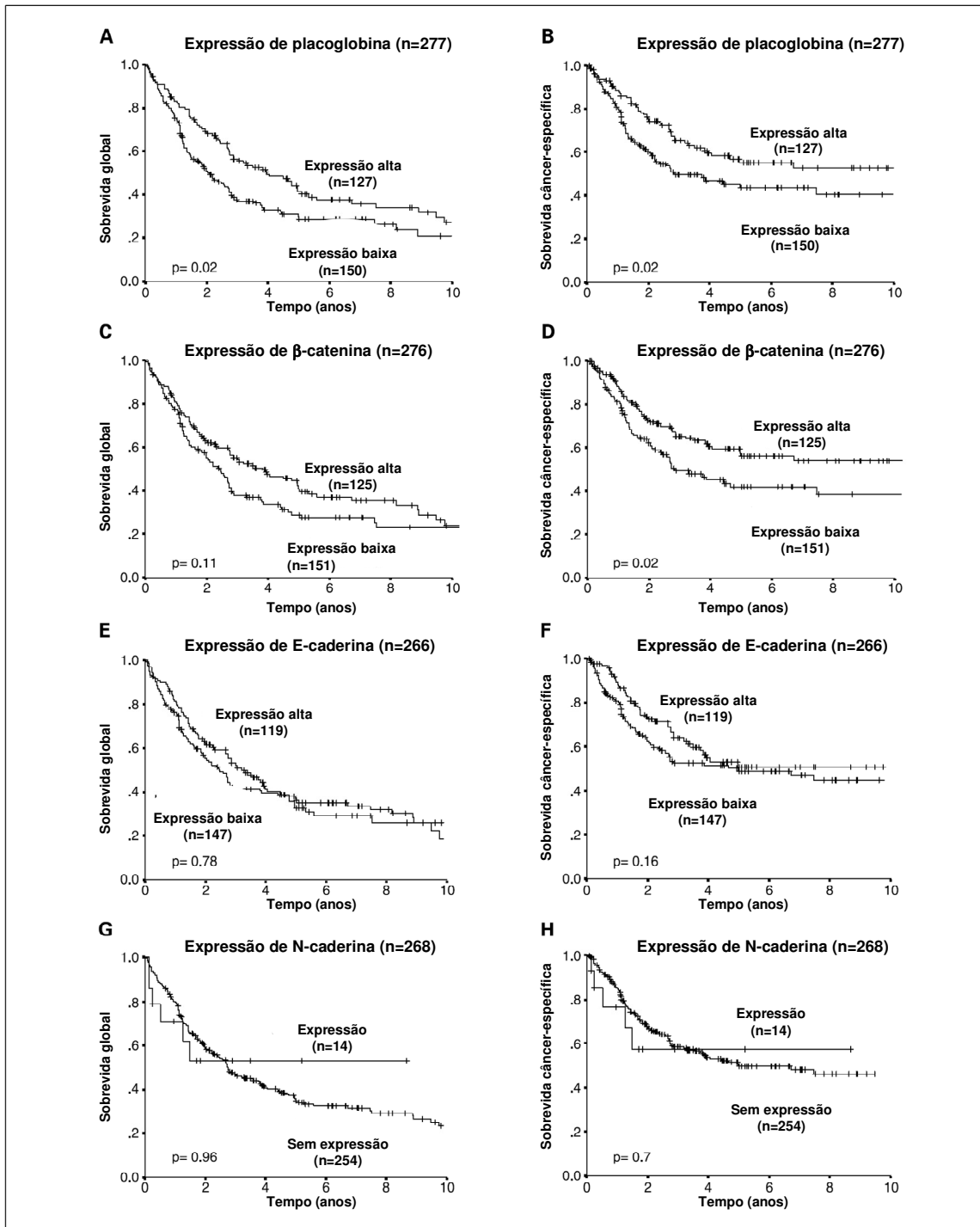


Figura 3 – Curvas de Kaplan-Meier em pacientes com cancer de bexiga, após a cistectomia radical. Expressão de Placoglobina – sobrevida global (A) e câncer-específica (B). Expressão de β -catenina - sobrevida global (C) e câncer-específica (D). Expressão de E-caderina - sobrevida global (E) e câncer-específica (F). Expressão de N-caderina - sobrevida global (G) e câncer-específica (H).

Bibliografia

1. Savagner P, Boyer B, Valles AM, Jouanneau J, Thiery JP. Modulations of the epithelial phenotype during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Treat Res* 1994;71:229–49.
2. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 1995;154:8–20.
3. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of the epithelial-mesenchymal transition in early development. *Mech Dev* 2003;120:1351–83.
4. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:442–54.
5. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:40–6.
6. Thompson EW, Newgreen DF. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005;65:5991–5.
7. Huber M, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:548–58.
8. Tarin D. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 2005;65:5996–6001.
9. Brabletz TA, Jung S, Reu M, et al. Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10356–61.
10. Nakajima S, Doi R, Toyoda E, et al. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:4125–33.
11. Bates RC. Colorectal cancer progression: integrin $\alpha_v\beta_6$ and the epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Cell Cycle* 2005;4:1350–2.
12. Girolidi LA, Bringuier P-B, Shimazui T, Jansen K, Schalken JA. Changes in cadherin-catenin complexes in the progression of human bladder carcinoma. *Int J Cancer* 1999;82:70–6.
13. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF- β induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 1994;127:2021–36.
14. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 2001;23:912–23.
15. Nawshad A, Lagamba D, Polad A, Hay ED. Transforming growth factor- β signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells Tissues Organs* 2005;179:11–23.
16. Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer Res* 2005;65:10938–45.
17. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* 2005;118:873–87.
18. Yang AD, Camp ER, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2006;66:46–51.
19. Lee J, Dedhar S, Kalluri R, Thompson E. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006;172:973–81.
20. Rieger-Christ KM, Ng L, Hanley RS, et al. Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. *Br J Cancer* 2005;92:2153–9.
21. Gee J, Greathead P, Little AF, Libertino JA, Summerhayes IC. Aberrant cadherin expression in bladder carcinoma cells. *Mol Urol* 1998;2:73–81.
22. Rieger-Christ KM, Cain J, Braasch J, et al. Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. *Hum Pathol* 2001;32:18–23.
23. Shimazui T, Schalken JA, Girolidi LA, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (α , β and γ -catenins and p120^{cas}) in bladder tumors. *Cancer Res* 1996;56:4145–58.
24. Yang J, Mami SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927–39.
25. Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2003;63:3386–94.
26. Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, et al. Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005;11:8006–14.
27. Arance A, Fabra A, Germá JR. Prognostic value of the expression of E-cadherin and β -catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:357–62.
28. Miahle A, Louis J, Montlevier S, et al. Expression of E-cadherin and α -, β - and γ -catenin in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invasion Metastasis* 1997;17:124–37.
29. Nakopoulou L, Zervas A, Gakiopoulou-Givalou H, et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and β -catenin in bladder cancer. *Eur J Cancer* 2000;36:357–62.
30. Shiina H, Igawa M, Shigeno K, et al. β -Catenin mutations correlate with over expression of c-myc and cyclin D1 genes in bladder cancer. *J Urol* 2002;168:2220–6.
31. Zhu X, Kanai Y, Saito A, Kondo Y, Hirohashi S. Aberrant expression of β -catenin and mutation of exon 3 of the β -catenin gene in renal and urothelial carcinomas. *Pathol Int* 2000;50:945–52.
32. Stoehr R, Kreig RC, Knuechel R, et al. No evidence for involvement of β -catenin and APC in urothelial carcinomas. *Int J Oncol* 2002;20:905–11.
33. Urakami S, Shiina H, Enokida H, et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2006;12:383–91.
34. Aaltomaa S, Lipponen P, Karja V, Lundstedt S, Lappi J, Kosma VM. The expression and prognostic value of α -, β -, and γ -catenins in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2004;24:2407–13.
35. Voutilainen KA, Anttila MA, Sillanpaa SM, et al. Prognostic significance of E-cadherin-catenin complex in epithelial ovarian cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:460–7.
36. Lascombe I, Clairotte A, Fauconnet S, et al. N-cadherin as a novel prognostic marker of progression in superficial urothelial tumors. *Clin Cancer Res* 2006;12:2780–7.
37. Rieger-Christ KM, Lee P, Zagha R, et al. Novel expression of N-cadherin elicits *in vitro* bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene* 2004;23:4745–53.
38. Summerhayes IC, Cheng YS, Sun TT, Chen LB. Expression of keratin and vimentin intermediate filaments in rabbit bladder epithelial cells at different stages of benzo[a]pyrene-induced neoplastic progression. *J Cell Biol* 1981;90:63–9.
39. Syrigos KN, Harrington K, Waxman J, Krausz T, Pignatelli M. Altered γ -Catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *J Urol* 1998;160:1889–93.
40. Clairotte A, Lascombe I, Fauconnet S, et al. Expression of E-cadherin and α -, β -, γ -catenins in patients with bladder cancer: identification of γ -catenin as a new prognostic marker of neoplastic progression in T₁ superficial urothelial tumors. *Am J Clin Pathol* 2006;125:119–26.

Artigo 2

Prognostic Significance of Altered p120^{ctn} Expression in Bladder Cancer

Prognostic Significance of Altered p120^{ctn} Expression in Bladder Cancer

Brasil Silva Neto^{*1,2}, Gjanje L. Smith^{*2}, Jessica A. Mandeville², Alex J. Vanni², Chad Wotkowicz², Kimberly M. Rieger-Christ^{1,2}, Egbert Baumgart², Micah A. Jacobs², Michael S. Cohen², Ron Zeheb³, Massimo Loda⁴, John A. Libertino² and Ian C. Summerhayes^{1,2,5}

*These authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

¹Cell and Molecular Biology Laboratory, R.E. Wise M.D. Research and Education Institute, Lahey Clinic, 31 Mall Road, Burlington, MA 01805. ²Departments of Urology and ³Pathology, Lahey Clinic, 41 Mall Road, Burlington, MA 01805. ⁴Department of Pathology, Dana Farber Cancer Center, 44 Binney Street, Boston, MA 02021

Short title: p120^{ctn} expression in bladder cancer

Grant Support - NIH 1DK59400

Word count: 3,188 – Number of text pages: 22

Number of tables: 2 – Number of figures: 6

⁵Corresponding Author: Ian C. Summerhayes

Robert E. Wise M.D. Research and Education Institute

Lahey Clinic, 31 Mall Road, Burlington, MA 01805

Telephone# (781) 744 2990

Fax# (781) 744 5226

E-mail: Ian.C.Summerhayes@lahey.org

Conflict of Interest: None

Abstract

Objective: To identify the frequency of change in the expression and localization of p120^{ctn} in bladder tumors and its association with clinical outcomes and to investigate the potential role of p120^{ctn} in the migratory and invasive behavior of bladder carcinoma cells.

Materials and Methods: A total of 425 superficial tumor specimens (Ta, Tis and T1) and 305 invasive (T2-T4) tumor specimens from 534 patients were assembled in ten tissue microarrays (TMA). P120^{ctn} immunostaining was scored for intensity and cellular localization and correlated with clinical variables and survival analysis. Knockdown of p120^{ctn} was achieved using siRNA followed by the assessment of migration and invasion behavior in standard *in vitro* assays.

Results: Expression levels of p120 catenin inversely correlated with pathological tumor stage ($p < 0.001$), histological grade ($p < 0.001$), presence of lymphovascular invasion ($p = 0.02$) but not node involvement ($p = 0.17$). Non-membranous localization of p120^{ctn} correlated with stage ($p < 0.001$), grade ($p < 0.001$), lymphovascular invasion ($p = 0.04$) and node positive disease ($p = 0.02$). Low expression level of p120^{ctn} was linked to a poor outcome in cancer-specific survival analysis. Knockdown of p120^{ctn} using siRNA resulted in a significant reduction in the migration and invasive potential of bladder carcinoma cells.

Conclusions: Our findings suggest that p120^{ctn} acts as a prognostic factor in bladder tumors and has a primary role to play in the migratory and invasive behavior of bladder carcinoma cells.

Keywords: p120^{ctn}, bladder cancer, tissue microarrays

Introduction

By the end of 2007 in the United States, bladder cancer will be diagnosed in more than 67,000 patients and there will be more than 13,500 deaths from this disease [1]. Transitional cell carcinoma is the most common form of bladder cancer where 70% of the patients present with a superficial, non-muscle invasive tumor that has a high recurrence rate (60-70%). In 20-30% of recurrent cases, muscle invasive disease is detected at a later stage conferring a significant change in prognosis [2]. For this reason there is a continuing interest in understanding the molecular mechanisms involved in the transition that leads to invasion. It has been shown that the cadherin/catenin complex stability plays an important role in this process where the loss of expression of different components of the complex can result in the generation of a more aggressive tumor profile [3, 4]. P120^{ctn} was originally identified as a substrate for src kinase and has subsequently been shown to be a part of the cadherin complex, binding to the juxtamembrane domain (JMD) of the cadherin molecule acting as a mediator of JMD function [5-8]. P120^{ctn} can also function as a transcriptional regulator [9, 10] and has the potential to be a regulatory element of similar importance and diversity of function as β -catenin. There exists multiple isoforms of p120^{ctn} [11] that are derived from alternative splicing of a single gene [12]. Recent work has defined a role for p120^{ctn} as a positive regulator of cadherin turnover whereby proper cadherin-dependent adhesion requires the presence of at least one member of the p120^{ctn} family [13-16]. From this work it is predicted that a dose-dependent loss of E-cadherin would occur in tumors that partially or

completely down-regulate p120^{ctn}. Indeed, restoration of p120^{ctn} expression in the SW48 cell line, where p120^{ctn} is mutated and the cadherin adhesion system is impaired, resulted in increased levels of E-cadherin with reactivation of cadherin function [13].

The loss or heterogeneous staining of p120^{ctn} has been reported in bladder tumor tissue albeit at a low frequency [17, 18]. Indeed, cytoplasmic and nuclear localization of p120^{ctn} has been reported in the absence of E-cadherin where restored expression of this cadherin resulted in a shift of p120^{ctn} from the cytoplasm to the membrane [19]. Interestingly, knockdown of p120^{ctn} results in destabilization of E-cadherin where premature loss of p120^{ctn} could represent another mechanism of E-cadherin loss in cancer [20]. Additional studies have shed light on p120^{ctn} associations with microtubule elements [21, 22], epidermal growth factor receptor signaling to p120^{ctn} [23] and signaling events involving RhoA GTPase linked to motility and cell scattering [24, 25]. It is also clear that the phosphorylation status of p120^{ctn} is important in cellular functional outcomes. In this study, we have focused on altered p120^{ctn} expression and localization in bladder cancer and the association with different clinical variables currently used for prognostication in the clinical setting.

Materials and methods

Clinical samples

We have used tumor tissue samples from patients diagnosed with bladder cancer at the Lahey Clinic Medical Center between 1990 and 2005 under an IRB approved protocol. Formalin-fixed, paraffin embedded tumor tissue from patients was retrieved and tumor stage was determined using TNM classification and graded according to WHO guidelines.

Construction and immunohistochemical staining of tissue microarrays

Seven hundred and thirty tumor samples from 534 patients were assembled in ten tissue microarrays (TMA's). Each TMA consisted of 400 tissue cores (4 cores per specimen) and control tissue cores for immunohistochemistry (IHC) validation and orientation. Individual TMA sections were deparaffinized and antigen retrieval was performed. The antibodies were diluted with Dako antibody diluent solution. IHC staining was performed on an automated stainer (Autostainer Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA) using a high sensitivity polymer-based detection system (EnVision™, Dako Corporation, Carpinteria, CA). A negative control was included using a non-specific mouse antibody solution (Dako Corporation, Carpinteria, CA) substituting for the primary antibody.

Antibodies

Antibodies to cytokeratin (Dako Corporation, Carpinteria CA) and pan-p120^{ctn} (BD Transduction Laboratories, San Diego, CA) were diluted 1:25 and 1:100, respectively, for use in IHC. Antibodies recognizing p120 isoforms 1 and 2 (5A7 and 6H11) were generous gifts from Dr Albert Reynolds (Vanderbilt University, TN). Antibodies to Akt, pAkt, MAP, MAPK, pStat-1, 3, 5 and 6 (Cell Signaling, Beverly MA) were used in Western blot analysis at 1:500 dilution.

Scoring of immunohistochemistry

The tissue sections were scored semi-quantitatively assessing staining intensity and protein localization including membrane, cytoplasmic or nuclear localization. For p120^{ctn} a staining intensity scale of 0-3 was applied. In tissue sections that displayed heterogeneous staining throughout the section the worst-case-scenario score was assigned to that sample when >5% of the tumor cells displayed this phenotype. Specimens that exhibited a complete absence of staining or faint staining in <5% cells were scored negative. Each TMA was scored independently by ICS and ML. Where discordant results were obtained both individuals re-reviewed the stained cores to obtain a consensus.

Statistical analysis

Comparisons of groups were performed by Student t-test and Pearson χ^2 . Correlation between markers was determined by Spearman's correlation coefficient. Univariate overall and cancer-specific survival analysis was performed using the product-limit procedure (Kaplan-Meier method), with the

surgery date as the entry date. The log-rank (Cox-Mantel) test was used to compare survival curves for different categories of each variable. Variables with impact on survival in univariate analyses were incorporated into a multivariate Cox proportional hazards regression model. Data were analyzed using the SPSS software package, version 11.5.

Cell culture

Human bladder cell lines RT4, RT112, HU456, BC16.1, CUBIII, 5637, PSI, HT1197, HT1376, SCaBER, EJ, KK47, J82, UM-UC-3, and TCCSUP were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 7.5% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin.

SiRNA knockdown

Pre-designed siRNA for p120^{ctn}, (SMARTpool siRNA, Dharmacon, Lafayette, CO) as well as scrambled controls were purchased. Cells were plated (1.2×10^5 /well) in a 12 well plate 24 hours prior to transfection. P120^{ctn} siRNA and a scrambled control sequence were introduced into cells using Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Migration and invasion assays

In vitro migration and invasion assays were carried out using modified Boyden chambers consisting of Transwell (8µm pore size; Corning Costar Corp.,

Cambridge, MA) membrane filter inserts in 24-well tissue culture plates. For invasion assays the upper surfaces of the membranes were coated with Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) and placed into 24-well tissue culture plates containing 600µl of NIH/3T3 conditioned media (experimental) or plain DMEM (control). No matrigel was used for migration assays where the chemoattractant was fibronectin (10µg/ml). Cells (1×10^6) were added to each Transwell chamber and allowed to migrate/invade toward the underside of the membrane for 16 hours at 37°C. Cells that pass through the membrane were fixed in methanol, stained with crystal violet and counted under a light microscope.

Western blot analysis

Subconfluent dishes of cells were washed in phosphate buffered saline (PBS) followed by lysis in hot sample buffer (2x ESB – 0.08M Tris, pH 6.8; 0.07M SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue and 1mM CaCl₂). Lysates were assayed for protein concentration using the BSA method (Pierce, Rockford, IL). After determination of protein content, β-mercaptoethanol (1%) was added to each sample. Samples were boiled for 5 minutes and protein was loaded in each lane of a polyacrylamide gel. Proteins were transferred overnight onto nitrocellulose. Membranes were blocked in 10% milk in TBS with 0.05% Tween (TBST) and incubated with primary antibody overnight at 4°C. Blots were washed in TBST, three times for 15 mins each, and incubated with secondary antibody linked to horseradish peroxidase for 60 minutes at room temperature.

Blots were then washed as described above and developed with an ECL kit
(Pierce, Rockford IL)

Results

P120^{ctn} expression profile in bladder tumors

The level of expression and localization of p120^{ctn} was assessed in tissue microarrays of primary bladder tumors (Figure 1A-1F). The construction of ten microarrays included 730 transitional cell carcinoma samples from 534 patients. The TNM's and histological grade of the samples is shown in Table 1. In this analysis the superficial tumor group included pTa, pTis and pT1 lesions with the invasive group represented by T2-T4 tumors.

A reduction or loss of expression of p120^{ctn} showed significant correlation with tumor grade, stage and vascular invasion but not with lymph node involvement. A reduction or loss of p120^{ctn} was recorded in 20.2% of superficial tumors and 32.5% of invasive tumors (Table 2). Cytoplasmic localization of p120^{ctn} (Figure 1D) was recorded in 25.1% of superficial tumors and 68% of invasive tumors ($p < 0.001$) and was also correlated with grade, lymph node involvement and vascular invasion. In samples displaying an abnormal expression or relocation of p120^{ctn}, loss or reduced expression of E-cadherin [4] was recorded in 83.8% ($R = 0.42$, $p < 0.001$) and 68.6% of the cases ($R = 0.4$, $p < 0.001$), respectively (figure 1C-F). Nuclear localization of p120^{ctn} (figure 1F) was identified in 21 tumors (2.5%) including 1/Ta, 9/T1 and 11/T2-T4, where nuclear staining observed in $>5\%$ tumor cells established a nuclear scoring classification. However, numerous additional samples displayed nuclear localization of p120^{ctn} in restricted tumor regions in $<5\%$ of the cells and were not recorded with p120 nuclear score (Figure 2).

Survival analysis

Survival analysis was confined to the cystectomy group of patients in which follow-up data was available. Mean follow-up for survivors was 5.02 ± 3.39 years. Univariate analysis for overall survival showed that neither the level of expression nor cytoplasmic localization of p120^{ctn} was significantly associated with patient survival. In contrast, when the outcome was limited to cancer-specific survival the loss or reduction in expression of p120^{ctn} was significantly different for survival ($p=0.03$). The 5- and 10-year cancer-specific survival rates were 43% and 38%, respectively, for loss or reduced expression of p120^{ctn} compared to 53% and 51%, respectively for normal levels of expression (Figure 3A). No significant association was recorded between the cytoplasmic relocalization of p120^{ctn} and cancer-specific survival (Figure 3B). As expected, T-stage, lymph node status and vascular invasion correlated with cancer-specific survival. In the multivariate analysis, vascular invasion was the strongest predictor for survival while the level of expression of p120^{ctn} no longer showed significant difference for cancer-specific survival.

Characterization of p120^{ctn} expression profile in bladder carcinoma cells

To establish the expression profile of p120^{ctn} in bladder carcinoma cells we initially screened a panel of fifteen cell lines for the expression of different p120^{ctn} isoforms. Figure 4 shows Western blot analyses of the cell panel demonstrating overall expression of p120^{ctn} isoforms along with the identification

of bladder carcinoma cell lines that displayed novel expression of p120^{ctn} isoforms-1 and 2. Using immunocytochemistry, no loss of expression or nuclear localization of p120^{ctn} was recorded in the bladder carcinoma cell lines (data not shown). However, a predominant cytoplasmic p120^{ctn} localization was recorded in cell lines with N-cadherin expression in the absence of E-cadherin.

SiRNA knockdown of p120^{ctn} in bladder carcinoma cells

To better understand the biological consequences of the loss or reduction of p120^{ctn} expression in bladder carcinomas we have selected representative cell lines, CUBIII and UM-UC-3, in which to knockdown p120^{ctn} using siRNA. These cell lines were selected based on their differing cadherin expression profiles where CUBIII expresses E- and P-cadherin and UM-UC-3 expresses N-cadherin alone [26]. Each cell line is considered representative of different stages of urothelial neoplastic progression. Knockdown of pan-p120^{ctn} was achieved using siRNA targeting all isoforms of p120^{ctn} and confirmed in Western blot analysis (Figure 5). The same cell population was used in migration and invasion assays. Reduced expression of p120^{ctn} in CUBIII cells resulted in decreased expression of E-, P-cadherin (Figure 5). In UM-UC-3 cells, reduced p120^{ctn} expression resulted in decreased N-cadherin (Figure 5). Repeated assessment of changes associated with alternative signaling molecules including the phosphorylated forms of Akt, MAP, Stat -1, 2, 3, 5, 6 and FAK revealed no consistent change in activity linked to reduced p120^{ctn} expression in the target cells (data not shown).

Reduced p120^{ctn} expression suppresses the migration and invasive potential

Screening of bladder cell lines in *in vitro* migration assays revealed significant inhibition in both CUBIII and UM-UC-3 bladder cell lines when p120^{ctn} was knocked down using siRNA. Parallel assessment of invasive potential using the same cells demonstrated reduced invasion of p120^{ctn} knockdown transfectants in both bladder carcinoma cell lines.

Discussion

In this study we have assessed the expression and localization of p120^{ctn} in a large series of well-characterized bladder tumors to investigate the potential prognostic value of changing events linked to different clinical parameters. We have identified a role for p120^{ctn} in the progression of bladder tumors from a superficial to an invasive stage and have reported the potential for this cadherin-binding protein(s) to act as a prognostic factor, either alone or in association with E-cadherin expression.

Aberrant expression and/or the cytoplasmic localization of p120^{ctn} have been reported correlated with a more aggressive tumor phenotype and poor survival in different tumor types [27-29]. Indeed, previous studies involving small sample sizes have shown that decreased p120^{ctn} expression is correlated with increasing grade and stage linked to poor prognosis in bladder cancer [17, 18, 30]. Our results, examining a much larger sample size (n = 730), demonstrated a significant difference in the occurrence of p120^{ctn} aberrant expression and relocalization when comparing superficial with invasive tumors, grade I/II with III tumors and vascular invasion. The presence or absence of nodal disease correlated with the cytoplasmic localization but not with the level of expression of p120^{ctn}. In survival analysis a poor prognosis was recorded linking reduced p120^{ctn} expression in cancer-specific survival. In the multivariate analysis, vascular invasion was the only independent predictor recorded. No association between p120^{ctn} parameters and overall survival was found. Since our survival analysis was restricted to the cystectomy group, it is probable that the striking

differences revealed in the comparisons between the superficial and invasive groups were attenuated and for this reason not revealed in the survival analysis. We have published that reduced expression of E-cadherin is associated with an invasive tumor phenotype in bladder cancer, with no difference in survival being observed [4]. When comparing the pattern of expression of p120^{ctn} and E-cadherin from the same samples in the tissue microarray, we recorded a high frequency of simultaneous occurrence of loss of E-cadherin in samples with abnormal expression or relocalization of p120^{ctn} with an intermediate correlation coefficient between the groups. We observed a worse prognosis for cancer-specific survival when p120^{ctn} and E-cadherin loss of expression were grouped.

The scoring of tissue microarrays is semi-quantitative, where we have selected a 5% cutoff for immunostained cells to score for a particular phenotype. However, we observed limited nuclear staining of p120^{ctn} (<5% cells stained) in numerous tumors that were scored negative in this study. With the recent discussions on the potential transient nature of events associated with the epithelial to mesenchymal transition (EMT), specifically the nuclear localization of catenins associated with the invasive edge of tumors [31, 32], we may have overlooked a significant biological event in these tissues. It is also of note that the scattered cells displaying nuclear p120^{ctn} were mainly localized to the epithelial layer abutting the stroma where the microenvironment may play a role in influencing the adjacent epithelial cell phenotype, albeit transitory in nature. P120^{ctn} binds to the JMD of the cadherin protein and has been shown to be important in the stabilization of the cadherin complex. Reports of the knockdown

of p120^{ctn} resulted in the loss of E-cadherin expression because of the destabilization of the cadherin complex in the absence of p120^{ctn}. In bladder cancer, loss or reduced E-cadherin expression has prognostic significance associated with an invasive phenotype and poor survival. In this study we have shown a strong association between E-cadherin expression status and that of p120^{ctn}. Such an association was also recorded in the panel of bladder carcinoma cell lines where the cytoplasmic localization of p120^{ctn} in the absence of an alteration in the expression level was associated with the loss of E-cadherin even in the presence of novel expression of N-cadherin. This phenotype was observed in the bladder cell lines characterized as invasive where we also recorded novel expression of p120^{ctn} isoforms 1 and 2. Whether the novel expression of p120^{ctn} isoforms 1 and 2 are directly involved in the invasive phenotype or linked to expression of N-cadherin in the absence of E-cadherin has yet to be determined in bladder carcinoma cells.

Reduced expression of p120^{ctn} using siRNA in bladder carcinoma cell lines resulted in decreased migration and invasion of cells with concomitant modulation of co-expressed cadherin and catenin molecules. In the CUBIII cell line, that co-expresses E- and P-cadherin, reduced p120^{ctn} expression resulted in the reduction of both of these classic cadherin members. Reduced E-cadherin is usually indicative of increased invasive potential, however, the opposite was recorded in CUBIII cells in these experiments. Although we do not know the role of P-cadherin in normal bladder mucosa or bladder neoplastic progression a recent publication, involving knockdown of p120^{ctn} in a colon carcinoma cell line,

also showed inhibition of migration [27]. Here, p120^{ctn} was found to have an inhibitory effect on RhoA, such that increased expression of p120^{ctn} led to decreased activity of RhoA and increased migration. Conversely, knockdown of p120^{ctn} with siRNA led to a loss of RhoA inhibition by p120^{ctn} and subsequent increase in RhoA activity. In UM-UC-3 cells, where N-cadherin is expressed in the absence of E- or P-cadherin, N-cadherin expression is reduced in siRNA p120^{ctn} knockdown cells. We have previously reported a role for N-cadherin in invasion in bladder carcinoma cells and demonstrated a direct link between N-cadherin expression and invasive potential [33]. Clearly, p120^{ctn} has a primary role to play in cell migration and invasion in bladder carcinoma cells and has the potential to act as a prognostic factor, either alone or in association with E-cadherin expression.

Acknowledgement

This work was supported by NIH 1DK59400 and the Lublin family (ICS). B. Silva

Neto M.D. was sponsored by CAPES/Brazil.

References

- [1] American Cancer Society: Facts and Figures. 2007 [cited 2007 07/19/2007]; Available from: http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2007.asp
- [2] Parekh DJ, Bochner BH, Dalbagni G. Superficial and muscle-invasive bladder cancer: principles of management for outcomes assessments. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 10;24(35):5519-27.
- [3] Kashibuchi K, Tomita K, Schalken JA, et al. The prognostic value of E-cadherin, alpha-, beta-, and gamma-catenin in urothelial cancer of the upper urinary tract. *European urology*. 2006 May;49(5):839-45; discussion 45.
- [4] Baumgart E, Cohen MS, Neto BS, et al. Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 15;13(6):1685-94.
- [5] Ohkubo T, Ozawa M. p120(ctn) binds to the membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain and is involved in modulation of adhesion activity. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jul 23;274(30):21409-15.
- [6] Aono S, Nakagawa S, Reynolds AB, Takeichi M. p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *The Journal of cell biology*. 1999 May 3;145(3):551-62.
- [7] Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *The Journal of cell biology*. 2000 Jan 10;148(1):189-202.

- [8] Anastasiadis PZ, Reynolds AB. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of cell science*. 2000 Apr;113 (Pt 8):1319-34.
- [9] van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, van Roy F. Nuclear localization of the p120(ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Jul 6;96(14):7980-5.
- [10] Daniel JM, Reynolds AB. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Molecular and cellular biology*. 1999 May;19(5):3614-23.
- [11] Mo YY, Reynolds AB. Identification of murine p120 isoforms and heterogeneous expression of p120cas isoforms in human tumor cell lines. *Cancer research*. 1996 Jun 1;56(11):2633-40.
- [12] Keirsebilck A, Bonne S, Staes K, et al. Molecular cloning of the human p120ctn catenin gene (CTNND1): expression of multiple alternatively spliced isoforms. *Genomics*. 1998 Jun 1;50(2):129-46.
- [13] Ireton RC, Davis MA, van Hengel J, et al. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *The Journal of cell biology*. 2002 Nov 11;159(3):465-76.
- [14] Peifer M, Yap AS. Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 2003 Nov 10;163(3):437-40.

- [15] Xiao K, Allison DF, Buckley KM, et al. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 2003 Nov 10;163(3):535-45.
- [16] Davis MA, Ireton RC, Reynolds AB. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of cell biology*. 2003 Nov 10;163(3):525-34.
- [17] Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer research*. 1996 Sep 15;56(18):4154-8.
- [18] Syrigos KN, Karayiannakis A, Syrigou EI, Harrington K, Pignatelli M. Abnormal expression of p120 correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *Eur J Cancer*. 1998 Dec;34(13):2037-40.
- [19] Sarrio D, Perez-Mies B, Hardisson D, et al. Cytoplasmic localization of p120ctn and E-cadherin loss characterize lobular breast carcinoma from preinvasive to metastatic lesions. *Oncogene*. 2004 Apr 22;23(19):3272-83.
- [20] Reynolds AB, Rocznik-Ferguson A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7947-56.
- [21] Franz CM, Ridley AJ. p120 catenin associates with microtubules: inverse relationship between microtubule binding and Rho GTPase regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Feb 20;279(8):6588-94.
- [22] Yanagisawa M, Kaverina IN, Wang A, Fujita Y, Reynolds AB, Anastasiadis PZ. A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Mar 5;279(10):9512-21.

- [23] Mariner DJ, Davis MA, Reynolds AB. EGFR signaling to p120-catenin through phosphorylation at Y228. *Journal of cell science*. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1339-50.
- [24] Cozzolino M, Stagni V, Spinardi L, et al. p120 Catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells. *Molecular biology of the cell*. 2003 May;14(5):1964-77.
- [25] Noren NK, Liu BP, Burridge K, Kreft B. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of cell biology*. 2000 Aug 7;150(3):567-80.
- [26] Gee J GP, Little AF, Libertino JA, Summerhayes IC. Aberrant cadherin expression in bladder carcinoma cell lines. *Molecular Urology*. 1998;2:73-81.
- [27] Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, Rimm DL, Mercurio AM. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease. *Cancer research*. 2005 Dec 1;65(23):10938-45.
- [28] Wang EH, Liu Y, Xu HT, et al. Abnormal expression and clinicopathologic significance of p120-catenin in lung cancer. *Histology and histopathology*. 2006 Aug;21(8):841-7.
- [29] van Hengel J, van Roy F. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochimica et biophysica acta*. 2007 Jan;1773(1):78-88.
- [30] Nakopoulou L, Zervas A, Gakiopoulou-Givalou H, et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, P120ctn in patients with transitional cell bladder cancer. *Anticancer research*. 2000 Nov-Dec;20(6B):4571-8.

[31] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature reviews. 2002 Jun;2(6):442-54.

[32] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. The Journal of cell biology. 2006 Mar 27;172(7):973-81.

[33] Rieger-Christ KM, Lee P, Zagha R, et al. Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. Oncogene. 2004 Jun 10;23(27):4745-53.

FIG. 1. IHC staining showing E-cadherin (A, C and E) and p120^{ctn} (B, D and F) in bladder tumours. A and B, superficial bladder tumour showing membrane localization of E-cadherin and p120^{ctn}, respectively; C and D, showing late-stage bladder tumour with loss of E-cadherin expression and cytoplasmic localization of p120^{ctn}, respectively; E and F, showing late-stage bladder tumour with loss of E-cadherin staining and cytoplasmic/nuclear localization of p120^{ctn}, respectively.

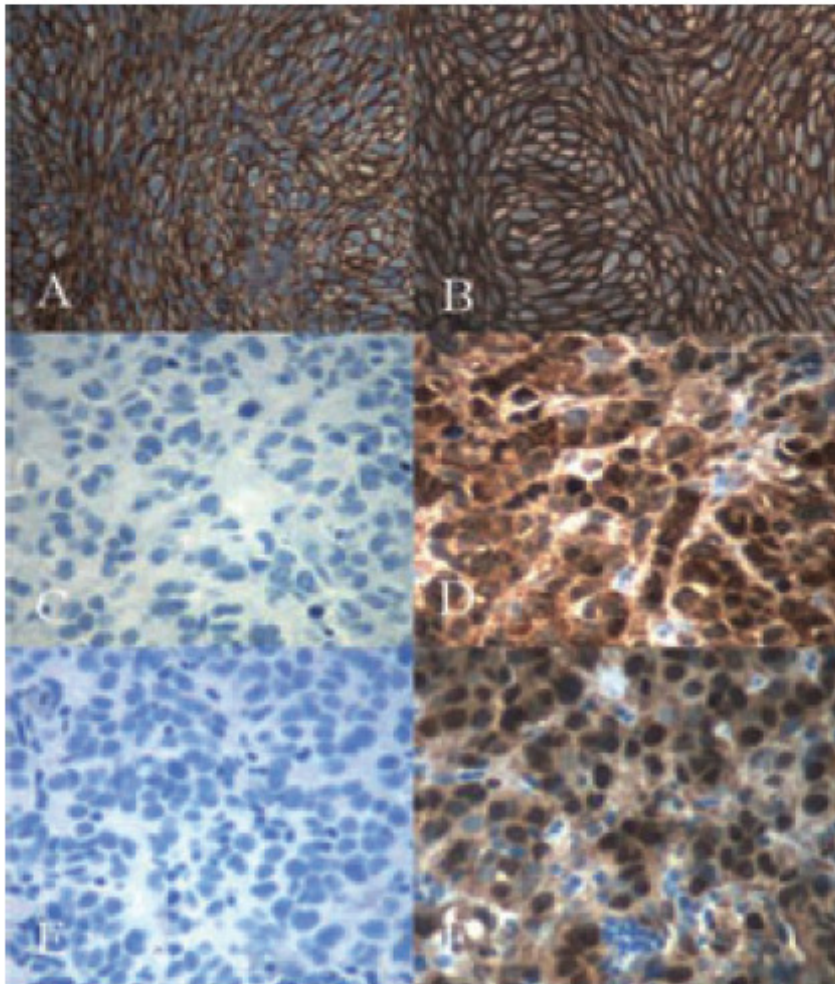


FIG. 2. IHC staining of the same bladder tumour showing loss of E-cadherin expression (A) and nuclear localization of p120^{ctn} in a limited number of tumour cells (B).

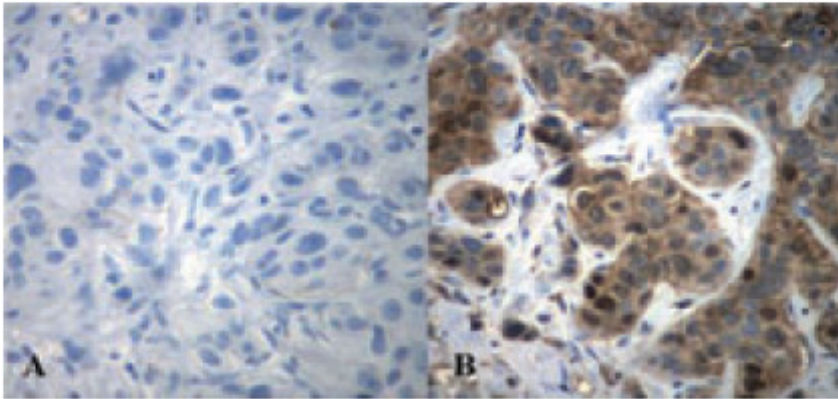
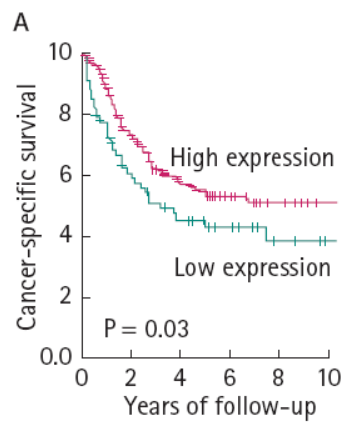
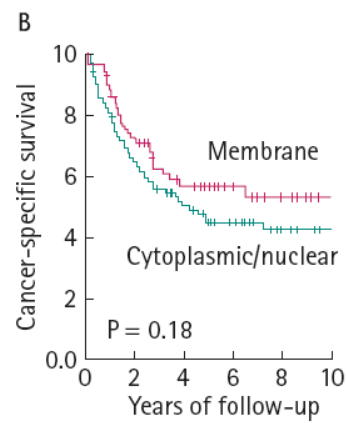


FIG. 3. Kaplan–Meier curves among patients with bladder cancer after radical cystectomy. A, p120^{ctn} expression levels (high and low) and CSS; B, p120^{ctn} localization (membrane vs cytoplasmic/nuclear) and CSS.



No. at Risk	
High expression	186 106 54 30 20 11
Low expression	86 40 22 14 8 5
Cumulative No. of Subjects with an End Point	
High expression	0 46 65 69 70 70
Low expression	0 32 41 42 43 43



No. at Risk	
Membrane	95 52 27 16 11 4
Cytoplasmic/nuclear	170 91 48 28 16 10
Cumulative No. of Subjects with an End Point	
Membrane	0 23 32 32 33 33
Cytoplasmic/nuclear	0 54 71 76 77 77

FIG. 4. Western blot analysis showing the expression profile of p120^{ctn} in a panel of bladder carcinoma cell lines. Upper panel shows total cell lysates probed with pan-p120^{ctn} showing all isoforms; lower panel probed with antibody recognizing p-120^{ctn} isoforms 1 and 2. Bladder carcinoma cell lines include lane 1 RT4; lane 2 RT112; lane 3 EJ; lane 4 UM-UC-3; lane 5 J82; lane 6 HT1376; lane 7 TCCSUP; lane 8 KK47; lane 9 CUBI11; lane 10 5637; lane 11 PSI; lane 12 HT1197; lane 13 SCaBER; lane 14 HU456; lane 15 BC16.1.

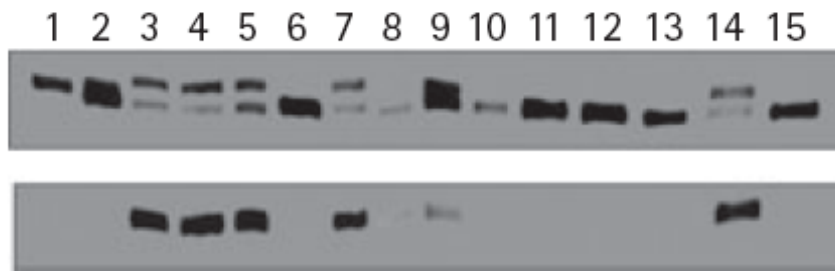


FIG. 5. p120^{ctn} siRNA knockdown in bladder carcinoma cell lines CUB111 (lanes A and B) and UM-UC-3 (lanes C and D). Scrambled siRNA control (lanes A and C) and p120^{ctn} siRNA (lanes B and D). Total cell lysates were probed with pan p120, E-, P-, N-cadherin and β -actin antibodies.

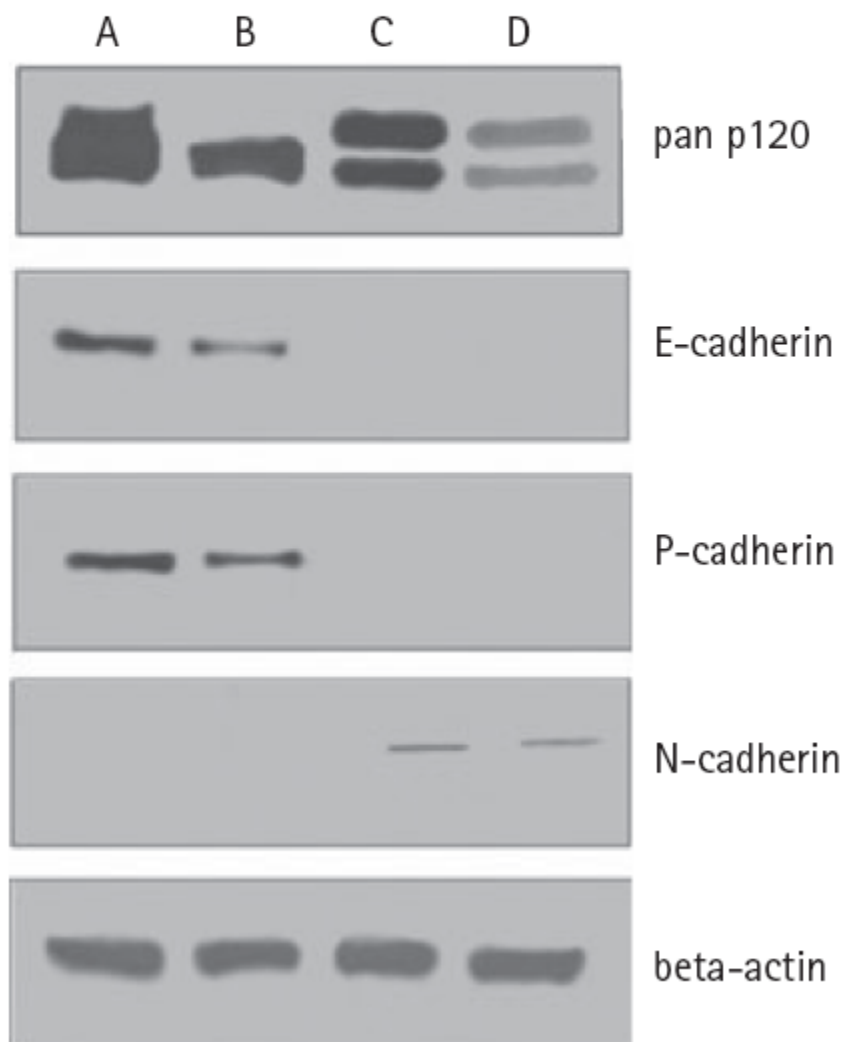
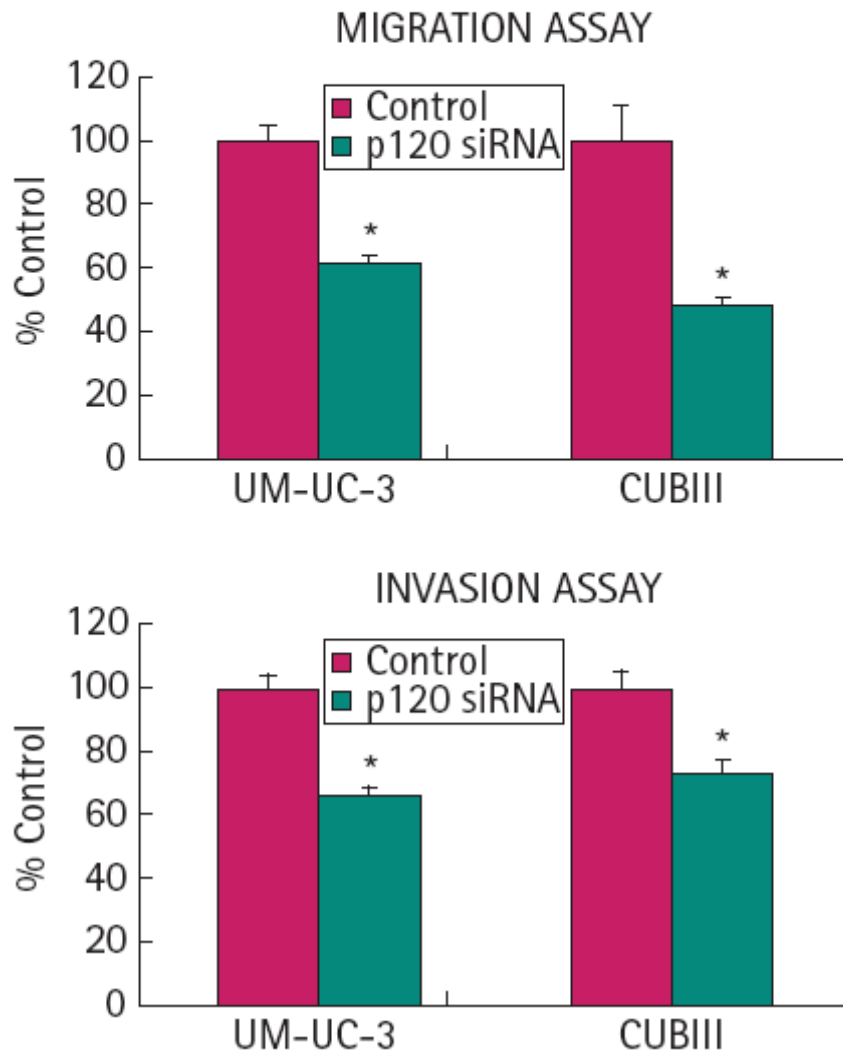


FIG. 6. Results from *in vitro* assays showing reduced cell migration and invasion after knockdown of p120^{ctn} in CUBIII and UM-UC-3 bladder carcinoma cell lines. **P* = 0.05 control vs experimental cells in three separate experiments performed in triplicate.



Artigo 3

P-cadherin as a Prognostic Indicator and a Modulator of Migratory Behaviour in Bladder Carcinoma Cells

P-cadherin as a Prognostic Indicator and a Modulator of Migratory Behavior in Bladder Carcinoma Cells

Jessica A. Mandeville^{*2}, Brasil Silva Neto^{*1,2}, Alex J. Vanni², Gjanje L. Smith², Kimberly M. Rieger-Christ^{1,2}, Ron Zeheb³, Massimo Loda⁴, John A. Libertino² and Ian C. Summerhayes^{1,2,5}

*These authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order

¹Cell and Molecular Biology Laboratory, R.E. Wise M.D. Research and Education Institute, 31 Mall Road, Burlington, MA 01805. ²Department of Urology and ³Pathology, Lahey Clinic, 41 Mall Road, Burlington, MA 01805. ⁴Department of Pathology, Dana Farber Cancer Center, 44 Binney Street MA 02021

Running title: P-cadherin in bladder cancer

Keywords: P-cadherin, bladder cancer, migration

⁵Corresponding Author: Ian C. Summerhayes

Cell and Molecular Biology Laboratory

Robert E. Wise M.D. Research and Education
Institute

Lahey Clinic

31 Mall Road, Burlington, MA 01805

Telephone# (781) 744 2990

Fax# (781) 744 5226

E-mail: Ian.C.Summerhayes@lahey.org

Abstract

Purpose: In this study we identified changes associated with P-cadherin expression in bladder cancer and evaluated the potential role of such events in determining clinical outcome and cell behavior.

Experimental Design: A total of 536 bladder tumor specimens from 408 patients were assembled in 7 tissue microarrays. Paraffin sections from each array were processed for immunohistochemistry for the expression of P-cadherin. Forced expression or knockdown of P-cadherin was performed in bladder carcinoma cell lines following transfection of the P-cadherin gene or siRNA, respectively.

Results: The absence of P-cadherin staining was associated with muscle invasive disease, grade 3 classification ($p < 0.001$) and nodal disease ($p = 0.009$). Similar results were obtained when considering cytoplasmic and unrestricted localization of P-cadherin ($P < 0.001$) with the exception of nodal involvement. The group with cytoplasmic localization of P-cadherin showed a shorter cancer-specific survival when compared to the group displaying membrane localization of P-cadherin ($p = 0.03$). Novel expression of P-cadherin in EJ and UM-UC-3 cells was accompanied by modulation in catenin expression. Enhanced migration of EJ and UM-UC-3/P-cadherin transfectants ($>200\%$) was recorded. Knockdown of constitutively expressed P-cadherin in cell lines (RT112, CUBIII) showed enhanced migratory potential in *in vitro* assays. Inhibition of Rho kinase activity resulted in reduced migratory potential of bladder carcinoma cells.

Conclusion: We showed that loss of expression, cytoplasmic relocation or unrestricted tissue localization of P-cadherin was associated with poor clinical

outcome and prognosis in bladder cancer. From our *in vitro* work it is clear that P-cadherin is a primary modulator of migration in bladder epithelial cells.

INTRODUCTION

Cadherins have been well described as transmembrane glycoprotein molecules involved in calcium dependent cell-cell adhesion (1-3). The classic cadherins, E-, P-, N- and R-cadherin possess an extracellular N-terminal domain, a transmembrane and a cytoplasmic carboxy-terminal domain. The cytoplasmic domain of the classic cadherins binds the catenin family members where associations are necessary to maintain the cell-cell adhesion function of the cadherin complex. Consistent with this concept, numerous studies have reported the altered expression status of individual catenins linked to prognosis in different cancers (4-9).

Classic cadherin profiles have been widely studied in a variety of human cancers revealing co-expression of classic cadherins in normal mucosa with often a change in cadherin expression profiles accompanying disease progression. The loss or reduced expression of E-cadherin expression is a common event in tumorigenesis resulting in increased migratory and invasive capacity with E-cadherin playing an invasive suppressor role (10, 11). In contrast, novel expression of N-cadherin has been recorded in different tumors (12-14) and has been shown to promote the invasive potential of epithelial cells *in vitro* (15-17). Although there have been few studies of R-cadherin expression in human tumors (18, 19) it is proposed that R-cadherin has a tumor suppressor function in gastrointestinal tumors (19) and has been shown to promote the migratory behavior of epithelial cells *in vitro* (20).

Although over expression of P-cadherin has been reported to promote the migratory and invasive behavior of breast and pancreatic carcinoma cell lines (21, 22) reduced P-cadherin expression has been reported associated with primary cultures from progressive melanomas (23) with restoration of P-cadherin expression in melanoma cell lines resulting in reduced invasive potential (24). Loss or reduced expression of P-cadherin in tumor tissue has been reported associated with different clinical parameters of poor prognosis in breast (25, 26), oral squamous cell carcinoma (27, 28) and melanocytic skin tumors (29). In contrast, alternative studies have reported elevated P-cadherin expression linked to tumor aggressiveness in endometrial cancer (30), melanocytic (31) and breast carcinomas (32, 33). Although P-cadherin may play a different role in tumor progression in different organs, there is no clearly identified role for P-cadherin as a clinical indicator of progression or outcome, in a specific cancer.

We have previously reported an association between decreased E-cadherin expression and later stage bladder tumors with poor prognosis (34). In addition, we have identified novel expression of N-cadherin in human bladder tumors (12) linked to invasive behavior in bladder carcinoma cells (17). In this study, we have investigated the expression profile of P-cadherin at different stages of urothelial neoplastic progression using tissue microarrays and have assessed the functional significance of modulation of P-cadherin expression in bladder carcinoma cell lines displaying different cadherin expression profiles.

MATERIALS & METHODS

Clinical Samples and TMA analysis

We have used tissue samples from patients diagnosed with bladder cancer at the Lahey Clinic Medical Center between 1990 and 2005 under an IRB approved protocol. Formalin-fixed, paraffin embedded tumor tissue from patients was retrieved from the archives of the Pathology Department. The tumor stage was determined using TNM classification and graded according to WHO guidelines.

Five hundred and thirty six tumors (269 superficial, 238 invasive and 29 Tx) were assembled in seven tissue microarrays (TMAs). All tumor cells were transitional cell carcinomas (TCC). Tissue microarrays were designed with replicas for each tumor sample and each control. Controls included normal tissue from prostate, testis, tonsil, liver, cerebellum, kidney, lung and bladder. Strategic placement of control cores in each TMA enabled definitive orientation during the scoring of the TMAs. Each TMA consisted of 400 tissue cores (4 cores per specimen) and control tissue cores for immunohistochemistry (IHC) validation and orientation. Multiple 4µm sections were cut and stored at 4°C in the presence of a dessicant prior to IHC staining. Individual TMA sections were deparaffinized and antigen retrieval in citrate buffer (pH 6.0; Dako Corporation, Carpinteria, CA) was performed. The antibodies were diluted with Dako antibody diluent solution. IHC staining was performed on an automated stainer (Autostainer Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA) using a high sensitivity polymer-based detection system (EnVision™, Dako Corporation, Carpinteria,

CA). A negative control was included using a non-specific mouse antibody solution (Dako, Corporation, Carpinteria, CA) substituting for the primary antibody.

Mouse monoclonal antibody to P-cadherin (Transduction Laboratories, Lexington, KY) was diluted at 1:100 for use in IHC. The negative control reagent (Dako Corporation, Carpinteria, CA) is a cocktail of non-immune mouse immunoglobulins (IgG and IgM) and is purchased pre-diluted. The specificity of the P-cadherin antibody in IHC was determined using xenograft sections derived from bladder cell lines in which the expression profile of P-cadherin, had previously been identified.

Scoring of Immunohistochemistry

The tissue sections were scored semi-quantitatively assessing staining intensity and localization including membrane or cytoplasmic. A staining intensity scale of 0-3 was applied. In normal bladder tissue cores the staining intensity was recorded as 3 where P-cadherin was localized to the basal cell layer. Staining was recorded as 0 only in the presence of an identifiable basal cell layer defined by the presence of a basement membrane and underlying stroma. When P-cadherin was observed staining throughout the tumor tissue, staining was recorded as unrestricted. In tissue sections that displayed heterogeneous staining throughout the section or between cores from the same tumor, the worst-case-scenario score was assigned to that sample when >5% of the tumor cells displayed this phenotype. Greater than 90% concordance between scores

from different cores of the same tumor was recorded. In samples where scoring differed between cores the worst-case-scenario score for expression level and localization was recorded for analysis. Specimens that exhibited a complete absence of staining or faint staining in <5% cells were scored negative. Each TMA was scored independently by ICS and ML. Where discordant results were obtained both individuals re-reviewed the stained cores to obtain a consensus. Expression of P-cadherin comparative to alternative proteins of the cadherin complex was performed using previously published results from the same TMA's (34) .

Statistical Analysis

Comparisons of groups were performed by Pearson χ^2 . Correlation between markers was determined by Spearman's correlation coefficient. Survival analysis was restricted to the cystectomy group where the follow-up data was available. Univariate overall and cancer-specific survival analysis was performed using the product-limit procedure (Kaplan-Meier method), with the surgery date as the entry date. The log-rank (Cox-Mantel) test was used to compare survival curves for different categories of each variable. Data were analyzed using the SPSS software package, version 11.5.

Cell Culture

The human bladder carcinoma cell lines EJ, UM-UC-3, RT112 and CUBIII were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin.

Antibodies and Inhibitor

Mouse monoclonal antibodies to cytokeratin, (Dako Corporation, Carpinteria CA) and P-cadherin (Transduction Laboratories, Lexington, KY) were diluted 1:25; and 1:100, respectively for use in IHC. The following antibodies were used in this study: MAPK, phosphorylated MAPK, AKT and phosphorylated AKT, STAT1, phosphorylated-STAT1 (1:500 dilution), STAT3, phosphorylated STAT3, FAK and phosphorylated FAK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α -tubulin (1:500 dilution, Sigma, St Louis MI). All antibodies were used in western blot analysis at 1:1000 dilution unless otherwise indicated. Cells were exposed to the biochemical inhibitor Y-27632 dihydrochloride monohydrate (25 μ m - Sigma, St Louis MI) for five hours in serum-free medium before harvesting for migration assays. Assays were performed in the continued presence of inhibitor.

Transfection

EJ and UM-UC-3 cells were plated at 3×10^5 cells per 60mm dish 24 hours before lipofection. The puromycin resistance gene alone or the P-cadherin construct (Origene, Rockville MD) plus the puromycin resistance gene were mixed with lipofectin reagent (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) and incubated with cells at 37°C overnight in the absence of serum. Following incubation, cells were

washed and maintained in standard medium. Forty-eight hours post-transfection, cells were split into puromycin containing medium (2 μ g/ml) to select successfully transfected colonies. Individual surviving colonies screened for drug selection were ring-cloned two weeks later. Each colony was taken through three rounds of limiting dilution for clonal selection.

SiRNA Knockdown

Pre-designed siRNA for P-cadherin (ON-TARGET*plus SMART*pool, Dharmacon, Inc, Lafayette, CO) as well as scrambled controls were purchased. RT112 and CUBIII cells were plated (1.2×10^5) in a 12 well plate 24 hours prior to transfection. Transfection of both P-cadherin SiRNA and scrambled controls was performed using Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Cells were harvested 48-hours post-transfection when lysates were analyzed in western blots to confirm knockdown of P-cadherin and assess the expression status of other proteins of interest.

Western Blot Analysis

Subconfluent dishes of cells were washed in PBS followed by lysis in hot sample buffer (2x ESB – 0.08M Tris, pH 6.8; 0.07M SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue and 1mM CaCl₂) and sheared through a 26-gauge needle. Lysates were then assayed for protein concentration using the BSA method (Pierce, Rockford, IL). After determination of protein content, β -mercaptoethanol (1%) was added to each sample. Samples were boiled for 5 minutes and protein

was loaded into lanes of a 7.5% polyacrylamide gel. Proteins were transferred overnight onto nitrocellulose. Membranes were blocked in 10% milk in TBS with 0.05% Tween (TBST) and placed on primary antibody overnight at 4°C. Blots were washed in TBST, three times for 15 minutes each wash and secondary antibody linked to horseradish peroxidase was incubated with the blots for 60 minutes at room temperature. Blots were then washed in TBST as previously described and developed with an ECL kit (Amersham, Arlington Heights, IL).

Immunoprecipitation

Subconfluent dishes of cell lines were lysed in 1ml of PBSTDS (phosphate buffered saline, pH7.4, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 2mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 100µg/ml aprotinin). Lysis was carried out on ice for 20 minutes followed by clarification in a microfuge at 4°C. Supernatants were removed and a 10µl aliquot was taken for protein estimation using the bovine serum albumin protein assay system (Pierce, Rockford, IL). For immunoprecipitation, protein concentrations were standardized between samples using 400µg protein from each preparation. Lysates were incubated overnight at 4°C with β -catenin (Transduction Laboratories, Lexington, KY) sandwiched with a goat anti-mouse anti-immunoglobulin whole molecule (Sigma, St Louis MI). Protein A-Sepharose beads were added the next morning and incubated with the mix for 90 minutes at room temperature. Immune complexes were washed 3 times in PBSTDS followed by three washes in 0.1% PBS. To disrupt protein complexes, 35µl of

reducing sample buffer was added to each sample, boiled for 5 minutes and loaded onto 7.5% acrylamide gels. Western blot analysis was then performed using P-cadherin as the primary antibody.

Migration and Invasion Assays

In vitro migration and invasion assays were carried out using modified Boyden chambers consisting of Transwell (8µm pore size; Corning Costar Corp., Cambridge, MA) membrane filter inserts in 24-well tissue culture plates. For invasion assays, the upper surfaces of the membranes were coated with Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) and placed into 24-well tissue culture plates containing 600 µl of NIH/3T3 conditioned media. For migration assays, no Matrigel was used and the chemoattractant consisted of 600µl fibronectin at a concentration of 10µg/ml. Cells (1×10^6) suspended in serum-free DMEM were added to each Transwell chamber and allowed to migrate/invade toward the underside of the chamber for 4-16 hours (dependent upon the cell line) at 37°C. Cells that passed through the membranes were fixed in methanol, stained with crystal violet, and counted under a light microscope.

Results

TMA Analysis

The construction of seven microarrays included 536 transitional cell carcinoma samples from 408 patients. The TNM's and histological grade of the samples is shown in Table 1A. In this analysis the superficial tumor group included pTa, pTis and pT1 lesions with the invasive group represented by T2-T4 tumors.

Membranous P-cadherin staining was observed in the basal cell layer of normal bladder mucosa (Fig. 1A). The absence of P-cadherin staining was recorded in 34.9% and 51.7% of superficial and invasive tumors, respectively ($p < 0.001$, Table 1B, Fig. 1B). When considering cytoplasmic and unrestricted localization of P-cadherin (Fig. 1C and 1D, respectively), similar results were recorded. Invasive tumors displayed cytoplasmic localization and unrestricted P-cadherin staining in 88.6% and 95.6% as compared to 65.1% and 73.7% in the superficial group, respectively ($p < 0.001$). High-grade transitional cell carcinomas (grade 3) were significantly linked to the same P-cadherin characteristics ($p < 0.001$, Table 1B). Nodal disease was correlated with the absence of P-cadherin expression (47.9% node negative versus 67.9% node positive, $p = 0.009$), but not with relocalization or unrestricted staining (Table 1B). No correlation between P-cadherin expression and lymphovascular invasion was observed. In the univariate survival analysis, the group with cytoplasmic localization of P-cadherin demonstrated a shorter cancer-specific survival when compared to the group displaying membrane localization of P-cadherin. The 5-year survival rate for the

cytoplasmic localization group was 55%, while no death events were recorded in the nine patients with P-cadherin membrane localization ($p=0.03$) (Fig. 2A). No significant cancer-specific survival difference was recorded between P-cadherin expression levels (Fig. 2B) and the restricted versus unrestricted localization of P-cadherin (Fig. 2C). No difference was recorded between all of the aforementioned groups for overall survival.

Comparative analysis of P-cadherin results with the expression of other members of the cadherin complex, as reported previously by this group using the same TMA's (34), revealed a significant correlation between absence of expression, cytoplasmic and unrestricted localization of P-cadherin with low expression and cytoplasmic localization of the cadherin complex components plakoglobin, E-cadherin, β -catenin, and p120^{ctn}. Here, coincident E-cadherin and P-cadherin cytoplasmic localization had the strongest correlation ($R=0.285$, $p<0.001$). Regarding mesenchymal markers, the novel expression of vimentin, correlated with cytoplasmic and unrestricted localization of P-cadherin ($R=0.23$, $p<0.001$ and $R=0.16$, $p=0.05$, respectively).

Establishment and Characterization of P-Cadherin Transfectants

EJ and UM-UC-3 bladder carcinoma cells were co-transfected with the P-cadherin and puromycin resistance gene. Following selection of puromycin resistant colonies total cell lysates were screened in Western blot analysis to identify P-cadherin expressing cells. Selected transfectants were taken through three rounds of limiting dilution and further screened to identify clones that

expressed P-cadherin at high levels (Fig. 3A). Clones expressing P-cadherin displayed a more flattened morphology in both EJ and UM-UC-3 recipients. Three P-cadherin expressing clones of EJ and UM-UC-3 were selected and maintained with three puromycin control clones and used in experiments throughout the study. Immunoprecipitation of β -catenin from each of these clones was performed to demonstrate co-precipitation of P-cadherin within a cadherin/catenin complex (Fig. 3B). Assessment of cadherin/catenin expression in the presence of forced P-cadherin expression revealed an increase in α and β -catenin, a decrease in plakoglobin (Fig. 3C and 3D) and no change in the levels of N-cadherin or p120^{ctn}. Immunocytochemical staining of transfectants revealed the presence of P-cadherin throughout the cytoplasm of EJ and UM-UC-3 transfectants with limited membranous staining (data not shown).

Migration and Invasion Potential

Screening of EJ and UM-UC-3/P-cadherin transfectants and control lines in *in vitro* migration assays revealed a significant increase in migratory capacity in P-cadherin expressing clones. In UM-UC-3/P-cadherin clones, migration was increased almost 3-fold over control cell lines (Fig. 4A). Similarly, in EJ transfectants expressing P-cadherin, migration was increased 2-fold over control lines (Fig. 4A). Using the same cell pool in parallel *in vitro* invasion assays we found no significant change in invasive potential between the P-cadherin expressing and control cell lines in repeated assays (data not shown).

Role of P-cadherin in Migration

To demonstrate a direct link between P-cadherin expression and increased migration we used siRNA to knockdown P-cadherin in EJ transfectants. Knockdown of P-cadherin was confirmed in Western blot analysis and a sample of the same cells was used in *in vitro* migration assays. Knockdown of P-cadherin expression in EJ transfectants resulted in reduced migratory potential to approximately 36-49% of that of the control clones represented by the same cells transfected with a scrambled sequence (Fig. 4B). EJ puromycin control transfectants displayed no significant migratory change in the same experiment.

To determine the effect of modulation of P-cadherin expression in cell lines that constitutively express this protein we transfected RT112 and CUBIII cell lines with P-cadherin siRNA. Decreased P-cadherin expression was confirmed in western blot analysis (Fig. 5A) with no detectable change in E-cadherin expression. The same knockdown cell pool was used in *in vitro* migration and invasion assays revealing increased migration potential approximately 2.5-fold and 1.7-fold over control cells in CUBIII and RT112 P-cadherin knockdown lines, respectively (Fig. 5B). No change was recorded in invasion assays (data not shown).

Signaling Events linked to P-cadherin Expression

To investigate the signaling pathway(s) linked to P-cadherin expression affecting migratory behavior we initially assessed the activation status of AKT,

MAPK, FAK, STAT1 and STAT3 where all remained unchanged in the presence of novel P-cadherin expression (data not shown). Since activation of Rho-family GTPases has been linked to P-cadherin induced motility in pancreatic carcinoma cells(22) we studied the effect of the Rho-kinase inhibitor, Y-27632, on *in vitro* migration of the bladder transfectants. Exposure of cells to Y-27632 inhibited the migration of UM-UC-3 control, UM-UC-3/P-cadherin, EJ control and EJ/P-cadherin transfectants, 42%, 58%, 57%, 58%, respectively (Fig. 6).

Discussion

Aberrant expression of the classic cadherins has been shown to be involved in a number of human cancers where the roles of E-cadherin and N-cadherin in tumorigenesis have been extensively studied. In contrast, little is known of the role of P-cadherin in normal tissue or whether changes in P-cadherin expression represent primary events in neoplastic progression. In this study we have assessed the expression and localization of P-cadherin in a large series of well-characterized bladder tumors to investigate the potential prognostic value of changing events linked to different clinical parameters. In addition, we have identified a role for P-cadherin in modulating the migratory behavior of bladder carcinoma cells.

P-cadherin is localized to the basal cells in normal bladder mucosa possibly linked to the proliferative potential or the differentiation status of this urothelial cell compartment. The apparent involvement of P-cadherin in bladder cell motility may indicate that P-cadherin plays a role in regulating the migration of basal cells to the intermediate cell layer in normal bladder mucosa. In urothelial

neoplastic progression aberrant expression of P-cadherin, including loss of expression, cytoplasmic and unrestricted localization, were found to be poor prognostic indicators linked to increasing grade and stage. However, only the absence of P-cadherin was significantly correlated with lymph node involvement but not lymphovascular invasion. Interestingly, reduced levels of P-cadherin have previously been reported associated with invasive bladder lesions in a study identifying differential gene expression patterns in superficial and invasive bladder tumors (35). In our study a significant differential in cancer-specific survival was recorded between patients where P-cadherin was localized to the cytoplasm or membrane. The 5-year survival rate was recorded as 55% for the cytoplasmic localization group while no deaths were observed in the membrane group within the period of observation. However, the latter group included only nine patients.

We have previously published the expression profile of different members of the cadherin complex including E-cadherin, β , γ and p120^{ctn} linked to prognosis using the same TMA's (34, 36). Integration of this data revealed a significant correlation between aberrant expression of P-cadherin and reduced expression, cytoplasmic localization of the aforementioned cadherin/catenin components, where coincident E- and P-cadherin cytoplasmic localization showed the strongest correlation. Reduced expression of E-cadherin within this tumor group has been shown to be associated with the invasive phenotype with no difference in survival (34). Previous reports involving immunostaining of P-cadherin in breast and melanocytic tumors have demonstrated clinical significance linked to

poor prognosis associated with both increased (31, 32) and decreased (25, 29) expression of P-cadherin in the same tissue. Hence, there is no clear picture as to the role of P-cadherin in the neoplastic process. It is possible that P-cadherin does not have a primary role to play in neoplasia, accounting for the lack of concordance between similar studies from the same tissue. However, it is of note that P-cadherin knockout mice are viable, unlike their E-cadherin counterparts, and display a phenotype of precocious mammary gland development leading to hyperplasia and dysplasia (37). Such events suggest a role for P-cadherin in neoplastic progression.

In a prognostic clinical scenario it may be necessary to partner P-cadherin status with additional biomarkers to attain any significant clinical correlates. The scoring of TMA's is semi-quantitative and given the restricted localization of P-cadherin in normal bladder mucosa caution is required in the scoring of tissue cores. For instance, the plane of the section can determine the staining observed i.e. a section through the tip of a well-differentiated papillary frond will display an absence of staining when indeed the lesion may retain a basal staining pattern. We would hope that the representation of four cores for each sample would resolve this issue, however, in this study we only recorded cores with an absence of staining if a basement membrane was present.

We have introduced P-cadherin into bladder carcinoma cell lines that lack E-cadherin and are representative of late-stage tumors where novel expression of N-cadherin in these cells has been shown to play a primary role in establishing the invasive phenotype (17). Forced P-cadherin expression significantly

enhanced the migratory potential of these cells but did not change their invasive capabilities. In contrast, knocking down P-cadherin in cells constitutively expressing E- and P-cadherin, resulted in an enhanced migratory potential. These apparent contradictory results likely demonstrate that the role of P-cadherin may differ at different stages of neoplastic progression possibly contingent on the cadherin/catenin expression profile of the cell. Our results suggest that P-cadherin suppresses the migratory behavior of cells at early stages of progression although it is not clear whether increased migration in knockdown experiments occurred directly as a result of reduced P-cadherin or secondary to other events.

We have looked at different signaling pathways implicated in cell motility recording no change in the activation status of multiple signaling proteins (AKT, MAPK, FAK, STAT1, STAT3) in the presence of P-cadherin expression. Use of the Rho-ROCK kinase inhibitor Y-27632 (38) revealed inhibition of migration in both control and P-cadherin transfectants with a significant increased inhibition of UM-UC-3 cell migratory potential in P-cadherin transfectants. These results suggest that the Rho-ROCK signaling pathway underlies motility in these cells and is further involved in UM-UC-3 cells in the presence of P-cadherin expression. However, different results from EJ/P-cadherin transfectants demonstrate that although this signaling pathway is involved in the migration of bladder carcinoma cells it does not represent the only player and is not solely linked to P-cadherin expression.

In this study we have shown that the loss of expression, the cytoplasmic relocation or unrestricted tissue localization of P-cadherin was associated with poor clinical outcome and prognosis in bladder cancer. In addition, it is clear from our *in vitro* work that P-cadherin is a primary modulator of migration in bladder epithelial cells.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the R. E. Wise Research and Education Institute. B. Silva Neto M.D. was sponsored by CAPES/Brazil.

FIG. 1. IHC staining patterns of P-cadherin in bladder tissue; (A) normal bladder mucosa showing basal location of membranous P-cadherin; (B) low-grade superficial papillary bladder tumour showing an absence of P-cadherin even in the basal cells abutting the basement membrane; (C) cytoplasmic location of P-cadherin throughout a high-grade tumour; (D) membrane-localized P-cadherin throughout the bladder tumour. Original $\times 400$.

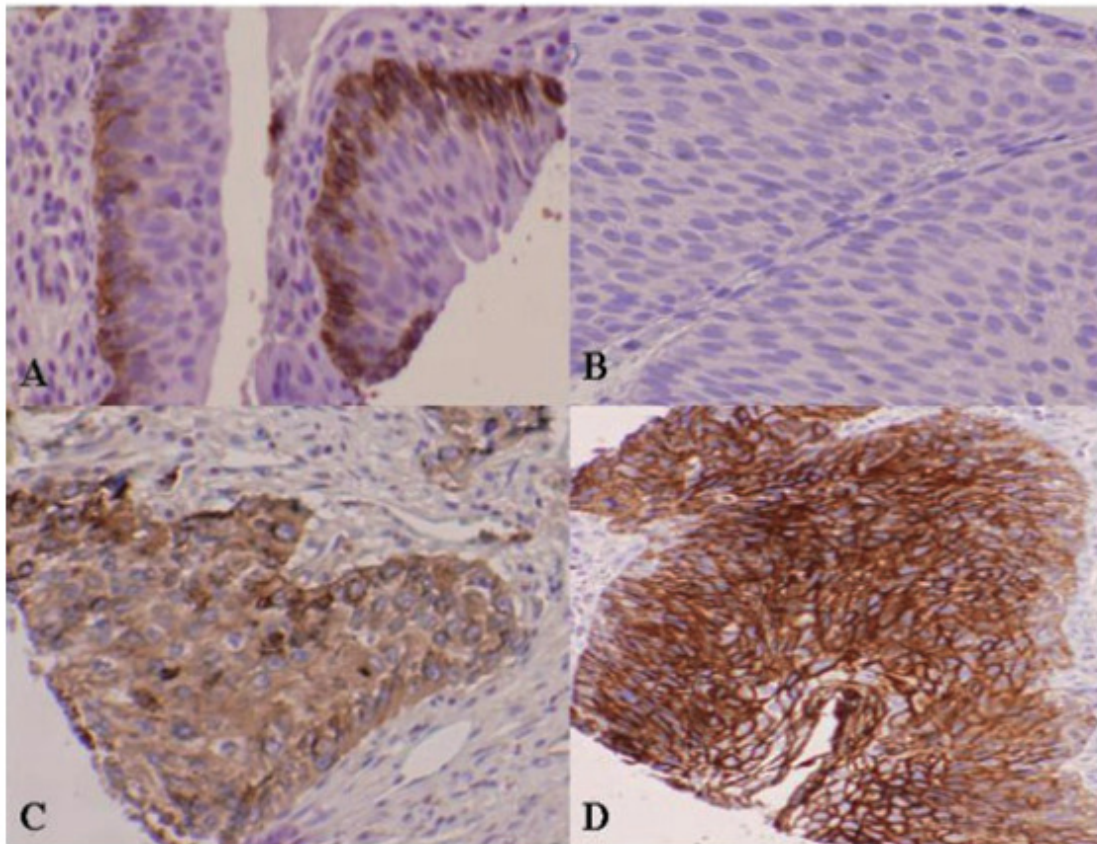


FIG. 2. Kaplan-Meier curves recording cancer-specific survival among patients with bladder cancer after cystectomy. P-cadherin expression (A) membrane or cytoplasmic location; (B) high or low expression levels; (C) restricted or unrestricted location in epithelial tissue. () represents the number of patients in each group.

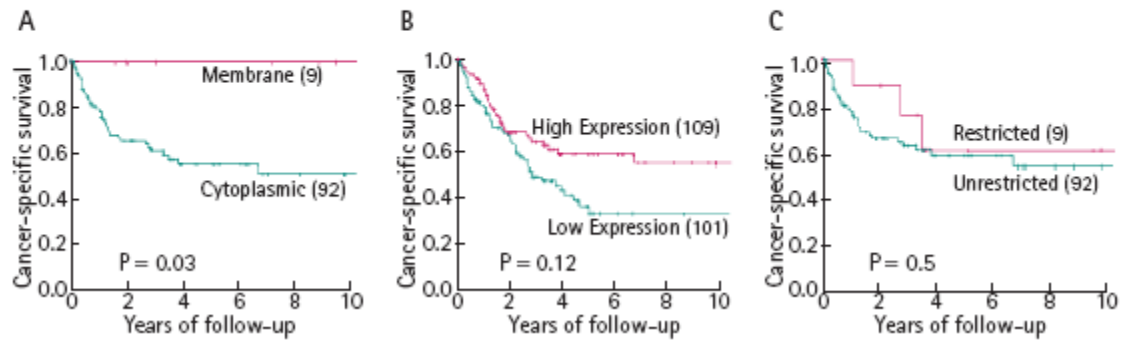


FIG. 3. Detection of P-cadherin protein in Western blot analysis using protein-standardized total cell lysates from transfectants (A,C,D) or after immunoprecipitation of β -catenin (B). In panels A-D, Lane 1, RT4 bladder carcinoma cell line; lane 2, EJ/puro 2; lane 3, EJ/puro 6; lane 4, EJ/puro 8; lane 5, EJ/P-cad 1; lane 6, EJ/P-cad 9; lane 7, EJ/P-cad 10; lane 8, UM-UC-3/puro 7; lane 9, UM-UC-3/puro 8; lane 10, UM-UC-3/puro 20; lane 11, UM-UC-3/P-cad 3; lane 12, UM-UC-3/P-cad 5; lane 13, UM-UC-3/P-cad 16. In panels C and D, catenin expression is recorded (α , β , γ and p120^{cas}) in total cell lysates from transfectants.

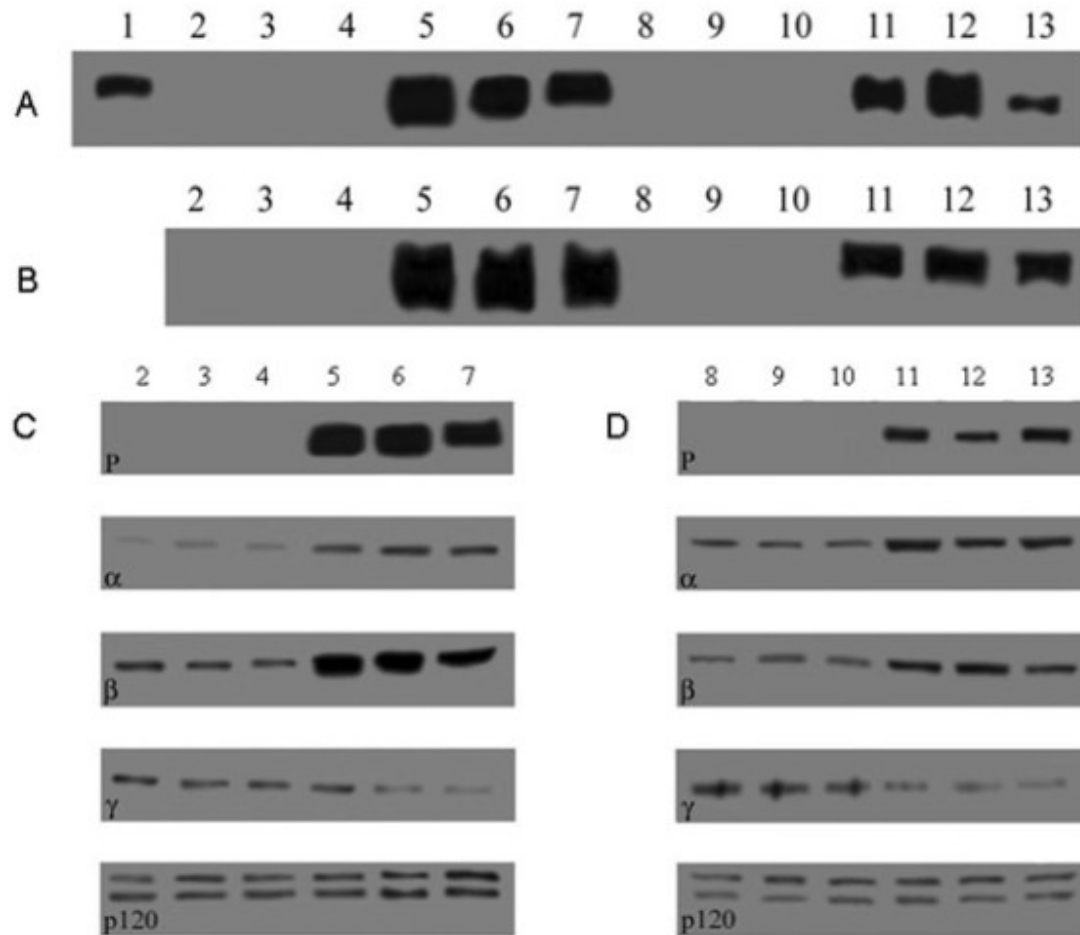


FIG. 4. Immunocytochemistry showing P-cadherin expression in EJ (A,B) and UM-UC-3 (C,D) transfectants. Panel A, EJ/puro 2; panel B, EJ/P-cad 1; panel C, UM-UC-3/puro 7; panel D, UM-UC-3/P-cad 3. Original $\times 200$.

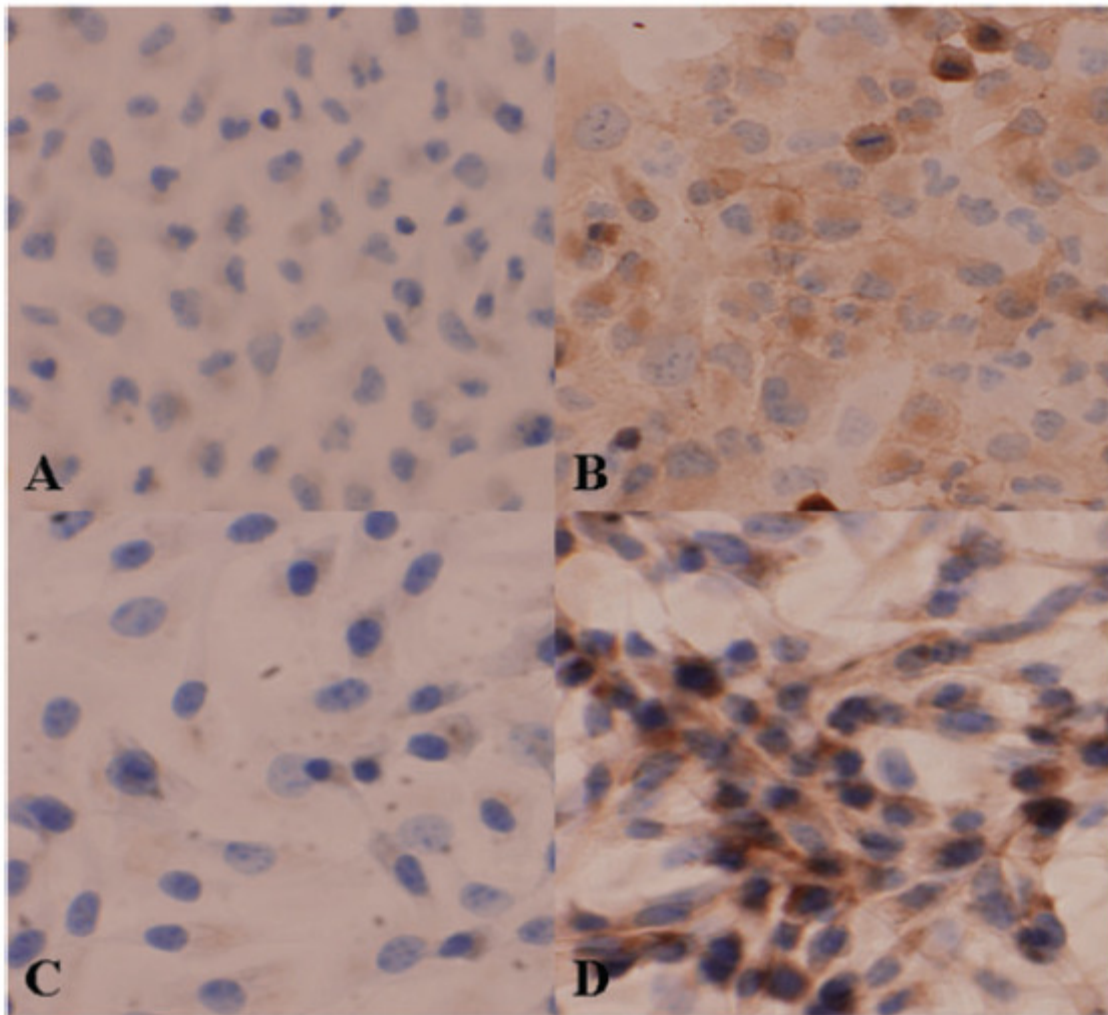
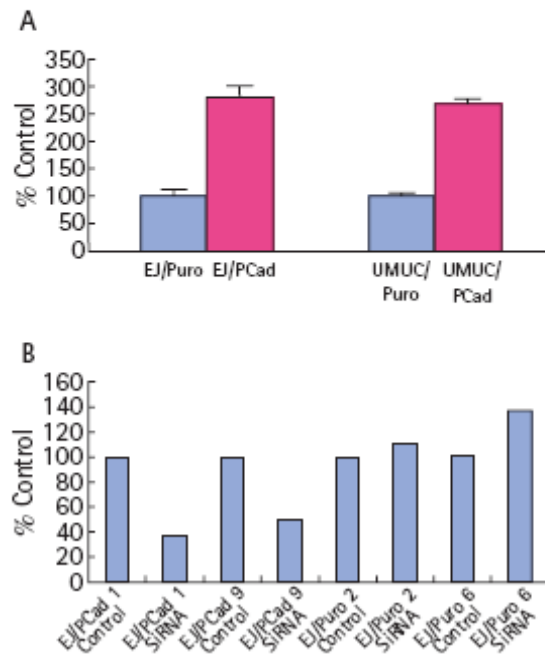


FIG. 5. *A*, In vitro migration results showing increased migration in representative clones of both EJ and UM-UC-3/P-cadherin transfectants compared to puromycin control cells. *B*, in vitro migration results in EJ/P-cad 1, EJ/P-cad 9, EJ/puro 2 and EJ/puro 6 after knockdown of P-cadherin using siRNA.



1. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherin-mediated cellular signaling. *Current opinion in cell biology* 2003;15: 509-14.
2. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current opinion in cell biology* 1995;7: 619-27.
3. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual review of cell and developmental biology* 2003;19: 207-35.
4. Otto T, Goepel M, Enzwi SM, Meyer-Schwickerath M, Rubben H. Motility- and adhesion factors in bladder carcinoma. *Investigative urology (Berlin, Germany)* 1994;5: 80-4.
5. Shimazui T, Schalken JA, Girolidi LA, *et al.* Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer research* 1996;56: 4154-8.
6. Mialhe A, Louis J, Montlevier S, *et al.* Expression of E-cadherin and alpha-,beta- and gamma-catenins in human bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invasion & metastasis* 1997;17: 124-37.
7. Bukholm IK, Nesland JM, Karesen R, Jacobsen U, Borresen-Dale AL. E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *The Journal of pathology* 1998;185: 262-6.
8. Syrigos KN, Harrington K, Waxman J, Krausz T, Pignatelli M. Altered gamma-catenin expression correlates with poor survival in patients with bladder cancer. *The Journal of urology* 1998;160: 1889-93.

9. Morita N, Uemura H, Tsumatani K, *et al.* E-cadherin and alpha-, beta- and gamma-catenin expression in prostate cancers: correlation with tumour invasion. *British journal of cancer* 1999;79: 1879-83.
10. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, *et al.* E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 1991;113: 173-85.
11. Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991;66: 107-19.
12. Rieger-Christ KM, Cain JW, Braasch JW, *et al.* Expression of classic cadherins type I in urothelial neoplastic progression. *Human pathology* 2001;32: 18-23.
13. Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, *et al.* Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer research* 2000;60: 3650-4.
14. Nagi C, Guttman M, Jaffer S, *et al.* N-cadherin expression in breast cancer: correlation with an aggressive histologic variant--invasive micropapillary carcinoma. *Breast cancer research and treatment* 2005;94: 225-35.
15. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology* 2000;148: 779-90.
16. Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of cell biology* 1999;147: 631-44.

17. Rieger-Christ KM, Lee P, Zagha R, *et al.* Novel expression of N-cadherin elicits in vitro bladder cell invasion via the Akt signaling pathway. *Oncogene* 2004;23: 4745-53.
18. Charrasse S, Comunale F, Gilbert E, Delattre O, Gauthier-Rouviere C. Variation in cadherins and catenins expression is linked to both proliferation and transformation of Rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 2004;23: 2420-30.
19. Miotto E, Sabbioni S, Veronese A, *et al.* Frequent aberrant methylation of the CDH4 gene promoter in human colorectal and gastric cancer. *Cancer research* 2004;64: 8156-9.
20. Johnson E, Theisen CS, Johnson KR, Wheelock MJ. R-cadherin influences cell motility via Rho family GTPases. *The Journal of biological chemistry* 2004;279: 31041-9.
21. Paredes J, Stove C, Stove V, *et al.* P-cadherin is up-regulated by the antiestrogen ICI 182,780 and promotes invasion of human breast cancer cells. *Cancer research* 2004;64: 8309-17.
22. Taniuchi K, Nakagawa H, Hosokawa M, *et al.* Overexpressed P-cadherin/CDH3 promotes motility of pancreatic cancer cells by interacting with p120ctn and activating rho-family GTPases. *Cancer research* 2005;65: 3092-9.
23. Seline PC, Norris DA, Horikawa T, Fujita M, Middleton MH, Morelli JG. Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation. *The Journal of investigative dermatology* 1996;106: 1320-4.

24. Van Marck V, Stove C, Van Den Bossche K, *et al.* P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma. *Cancer research* 2005;65: 8774-83.
25. Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, *et al.* Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. *Mod Pathol* 2001;14: 423-7.
26. Kovacs A, Walker RA, Nagy A, Gomba S, Jones L, Dearing S. [Immunohistochemical study of P-cadherin in breast cancer]. *Orvosi hetilap* 2002;143: 405-9.
27. Lo Muzio L, Pannone G, Mignogna MD, *et al.* P-cadherin expression predicts clinical outcome in oral squamous cell carcinomas. *Histology and histopathology* 2004;19: 1089-99.
28. Lo Muzio L, Campisi G, Farina A, *et al.* P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC cancer* 2005;5: 63.
29. Bauer R, Wild PJ, Meyer S, *et al.* Prognostic relevance of P-cadherin expression in melanocytic skin tumours analysed by high-throughput tissue microarrays. *Journal of clinical pathology* 2006;59: 699-705.
30. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Prognostic impact of alterations in P-cadherin expression and related cell adhesion markers in endometrial cancer. *J Clin Oncol* 2004;22: 1242-52.
31. Bachmann IM, Straume O, Puntervoll HE, Kalvenes MB, Akslen LA. Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of

melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11: 8606-14.

32. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* 2005;11: 5869-77.

33. Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, *et al.* Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11: 4003-11.

34. Baumgart E, Cohen MS, Neto BS, *et al.* Identification and prognostic significance of an epithelial-mesenchymal transition expression profile in human bladder tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13: 1685-94.

35. Thykjaer T, Workman C, Kruhoffer M, *et al.* Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer research* 2001;61: 2492-9.

36. Neto BS, Smith GL, Mandeville JA, *et al.* Prognostic significance of altered p120(ctn) expression in bladder cancer. *BJU Int* 2007.

37. Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, *et al.* Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *The Journal of cell biology* 1997;139: 1025-32.

38. Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP. Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human

prostate cancer cells. Biochemical and biophysical research communications
2000;269: 652-9.

Conclusões

A perda de expressão e a realocização de marcadores epiteliais do complexo caderina-catenina, avaliada por microarranjos de tecidos, está ligada a fatores clínicos de pior prognóstico em tumores uroteliais de bexiga;

A expressão de Vimentina nestas amostras correlaciona-se diretamente com o estágio e grau da lesão;

A expressão da p120-catenina influencia a capacidade de migração e de invasão celular *in vitro*;

A expressão de P-caderina influencia a capacidade de migração celular *in vitro*;

Estes achados reforçam a importância do papel do complexo caderina-catenina no processo de Transição Epitélio-Mesenquimal nos tumores uroteliais de bexiga.