

A DELECCÃO DO GENE *TP53* E A ACUMULAÇÃO DO P53 (AB-240) SÃO IMPORTANTES NA DETERMINAÇÃO DO PROGNÓSTICO NO CARCINOMA UROTELIAL DA BEXIGA

Sofia Pereira

Mestre Assistente, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
Grupo de Investigação de Patologia e Oncologia Molecular - Centro de Investigação do IPO,
Porto
sofia@ufp.pt

Céu Costa

Mestre Assistente, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
Grupo de Investigação de Patologia e Oncologia Molecular - Centro de Investigação do IPO,
Porto

Catarina Lameiras

Grupo de Investigação de Patologia e Oncologia Molecular - Centro de Investigação do IPO,
Porto

Teresina Amaro

Serviço de Anatomia Patológica - IPO, Porto

Maria Bento

Serviço de Epidemiologia - IPO, Porto

Alberto Koch

Serviço de Urologia - IPO, Porto

Lúcio Santos

Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
Departamento de Oncologia Cirúrgica - IPO, Porto
Grupo de Investigação de Patologia e Oncologia Molecular - Centro de Investigação do IPO,
Porto

Abstract

TP53 gene deletions or mutations were related to more aggressiveness in invasive and *in situ* bladder tumors. However, its prognostic value in the superficial ones is not well defined. Sixty-two cases with low-grade superficial urothelial cell carcinomas (UCCs) were studied. Twenty-two suffered recurrence and 10 of these progressed. FISH for *TP53* detection and immunohistochemistry for p53 with both DO7 and Ab-240 antibodies were used. *TP53* aberrations were suggestively related to p53 (Ab-240) positive immunoeexpression ($p=0.06$). The 5-year recurrence-free survival was significantly lower ($p=0.002$) in cases with *TP53* monosomic deletion and these had a much lower 5-year progression-free survival ($p=0.075$). The p53 (Ab-240) negative cases showed a significantly better outcome ($p=0.04$). The superficial papillary UCCs with *TP53* monosomic deletion or p53 Ab-240 positive immunoeexpression had a poor outcome, being these surrogate biologic factors of poor prognosis.

Key-words

Bladder cancer, p53, prognosis

Resumo

As deleções ou mutações do gene *TP53* têm sido relacionadas com a maior agressividade dos carcinomas da bexiga *in situ* ou invasores. No entanto, o seu valor prognóstico nos tumores superficiais ainda não está definido. Foram estudados 62 tumores da bexiga superficiais e de baixo grau. Vinte e dois sofreram recorrência e 10 destes progrediram. Utilizou-se o FISH para a detecção do gene *TP53* e a imunohistoquímica para a proteína p53 com os anticorpos DO7 e Ab-240. As alterações do gene *TP53* relacionaram-se com a imunoeexpressão positiva da p53 (Ab-240; $p=0,06$). A sobrevivência livre de recorrência aos 5 anos foi significativamente menor ($p=0,002$) nos doentes cujos tumores tinham deleção do gene *TP53*, tendo também uma menor sobrevivência livre de progressão ($p=0,075$). Os doentes cujos tumores eram negativos para a p53 (Ab-240) mostraram resultados significativamente melhores ($p=0,04$).

Os doentes cujos tumores apresentavam deleção do gene *TP53* ou imunoeexpressão para a p53 com o anticorpo Ab-240, mostraram piores resultados, podendo estes ser potenciais marcadores biológicos de pior prognóstico.

Palavras-chave

Carcinoma da bexiga, p53, prognóstico

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma urotelial da bexiga (UCC) é a forma mais comum de cancro da bexiga. Aproximadamente 80% dos UCCs são lesões papilares e superficiais (Ta/T1); apesar de, na sua maioria, não progredirem, cerca de 60 % recidivam e 20% tornam-se invasores (Knowles, 1998; Zieger, 2000). Contudo, os doentes com recidivas múltiplas possuem um risco mais elevado de progressão (Herr, 2000; Lamm, 2000). Actualmente, nenhum marcador biológico pode prever com segurança a evolução desta neoplasia.

O *TP53* é o gene mais vezes alterado nos tumores malignos humanos, e o cancro da bexiga não é uma excepção. Este gene, localizado no cromossoma 17p13, pode ser alterado quer por deleção quer por mutação (Olumi, 2000; Rangel-Lopez, 2005). A alteração mais frequente é a mutação *missense* do gene *TP53*; contudo, modificações pós-transcricionais podem também afectar a proteína p53. Esta proteína é um factor transcricional que regula muitos genes críticos na homeostase celular (Vogelstein, 2000). O *TP53* está frequentemente alterado em carcinomas uroteliais avançados e também em lesões superficiais do tipo plano (CIS), lesão de alto grau que tem elevada propensão para tornar-se um carcinoma invasor (Spruck, 1994). No cancro de bexiga invasivo as mutações do gene *TP53* mais comuns ocorrem nos exões 7 e 8 (Abdel-Fattah, 1998), estando estas alterações genéticas fortemente associadas com o aumento da imunoreactividade da proteína p53. Muitos estudos clínicos têm utilizado a imunoreactividade desta proteína em tumores de bexiga com o objectivo de identificar doentes com elevado risco de recidiva ou progressão desta doença. Porém, até agora, a frequência e o significado da proteína p53 ou das alterações do gene *TP53* no carcinoma superficial de bexiga, com morfologia papilar, mantém-se controversa (Lee, 2000). Com o objectivo de clarificar o papel das alterações numéricas do gene *TP53* e a acumulação da proteína p53, assim como o valor clínico destes factores no carcinoma urotelial de bexiga com morfologia superficial, estudaram-se 62 UCCs papilares primários (Ta/T1) e a sua respectiva recidiva, usando a técnica de hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) e imunohistoquímica (IHC).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O gene *TP53* e a imunoeexpressão do p53 foram estudados em 62 casos de carcinoma urotelial de bexiga, admitidos e tratados no Instituto Português de Oncologia (Porto) desde 1990 até 1996. Estes doentes (13 mulheres e 49 homens), foram consecutivamente admitidos e submetidos a tratamento com intenção curativa. A ressecção trans-uretral (RTU) isolada foi realizada em 23 (37,1%) doentes, enquanto que 39 (62,9%) receberam também tratamento intra-vesical adjuvante. A idade mediana foi de 63 anos (variando entre 23 - 83 anos); 21 (33,9%) doentes tinham idade inferior a 46 anos. O seguimento mediano foi de 73,7 meses (4 - 99,4 meses). A *recidiva* foi definida como uma lesão *de novo* na bexiga após tratamento com intenção curativa e com, pelo menos, uma cistoscopia e uma citologia negativas. A progressão da doença foi definida como a recidiva local com aumento de grau (quando comparada com o tumor primário) e/ou estágio. Cistoscopia e citologia positivas antes dos 4 meses de seguimento foram consideradas persistências tumorais. Todos os tipos de tumores foram classificados de acordo com a classificação histológica proposta em 1973 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Mostofi, 1993) e o estágio foi estabelecido de acordo com o sistema de AJCC (AJCC, 1997) e com as recomendações WHO/ISUP em relação à invasão da muscular da mucosa (Epstein, 1998). Assim tumores que invadem a membrana

basal mas não a muscular da mucosa foram classificados como pT1a, aqueles que invadem a muscular da mucosa foram classificados como pT1b. Nenhum caso grau 3 foi incluído.

2.1. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53

O método da imunoperoxidase foi usado para a detecção da proteína p53 em tecidos tumorais, preservados em parafina e fixados em formol tamponado. Dois anticorpos monoclonais específicos para a proteína p53 (DO7, *Dako*® com a diluição 1:100 e Ab-240, *NeoMarkers*® com a diluição 1:100) foram usados como anticorpos primários. O anticorpo DO7 reconhece tanto a proteína mutada como a *wild-type*, enquanto que o Ab-240 reconhece apenas a proteína mutada (correspondendo à mutação no exão 7). Cortes de 4,5 µm foram desparafinados com xilol e etanol, submetidos posteriormente à recuperação antigénica (em microondas) e inibição das peroxidases endógenas com a solução de peróxido de hidrogénio 0,3% e metanol. As ligações não específicas foram bloqueadas pela Albumina de Soro Bovino (BSA) 10% em tampão fosfato salino (PBS). Os cortes foram incubados com o anticorpo primário a 4°C, durante a noite. Depois da lavagem em PBS, estes foram incubados, à temperatura ambiente, durante 10 minutos com o anticorpo secundário (imunoglobulinas biotiniladas de coelho anti-rato) usando o kit K335 *Dako*®. Depois da lavagem em PBS, os cortes foram incubados na solução de Tris-HCl a 0,05M, tetrahydroclorido 3,3-diaminobenzidina a 0,05% e peróxido de hidrogénio a 0,01%, para visualizar os locais de ligação do anticorpo. Finalmente, os cortes foram contrastados com hematoxilina.

Controlos positivos e negativos apropriados foram usados para cada anticorpo. Nos casos negativos procedeu-se à substituição do anticorpo primário por BSA em tampão Tris salino (TBS), os controlos positivos consistiram em tumores de bexiga com imunoreactividade conhecida para cada anticorpo.

2.2. QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO

O corte foi observado com o objectivo de determinar a região com maior taxa de acumulação de p53 nuclear. A percentagem de células com acumulação nuclear foi definida contando cerca de 200 células ao acaso, usando a objectiva de 40x. Definiu-se como positivo a presença de ≥20% de núcleos contíguos com imunoreactividade para a p53, de acordo com estudos prévios (Gao, 2000). A avaliação imunohistoquímica foi realizada por dois observadores independentes (T.A. e L.S.).

2.3. ANÁLISE DA HIBRIDAÇÃO IN SITU DE FLUORESCÊNCIA

Para a análise do gene *TP53* foi usado uma sonda de sequência única (Oncor®) específica para aquele gene. A técnica foi seguida de acordo com as instruções dos fabricantes com ligeiras modificações. A microdissecção das áreas do tumor foi realizada de acordo com a opinião do patologista. Em lâminas silanizadas foram feitos cortes de 4 µm do tumor, tendo sido posteriormente desparafinados e pré-tratados com 1M NaSCN (Merck ®) a 80°C e pepsina (4 mg/ml) a 37°C. A desnaturação da sonda e do material tumoral foi realizado simultaneamente, numa câmara escura a 80°C, durante 10 minutos, seguindo-se a hibridação a 37°C durante a noite. Foram realizadas lavagens pós-hibridação em 2x SSC (pH=7) a 72°C.

O fluorocromo FITC (Oncor[®]) foi usado para a detecção do sinal. O núcleo foi contrastado com iodeto de propídio (Oncor[®]).

2.4. INTERPRETAÇÃO DA ANÁLISE POR FISH

As lâminas de FISH foram avaliadas por contagem de, pelo menos, 200 núcleos em cada corte, usando um microscópio de fluorescência equipado com a objectiva de óleo de imersão de 100x (Nikon[®]). O número de sinais fluorescentes foi determinado em cada núcleo. Núcleos cujos sinais não fossem claros (bem definidos) ou núcleos sobrepostos foram excluídos da análise. Mucosas normais (provenientes de doadores cadavéricos) foram usadas como controlo. De acordo com o critério usado, a prevalência de uma cópia (monossomia do *TP53*) ou de, pelo menos, 3 cópias (polissomia do *TP53*) foram apenas considerados quando a percentagem presente de núcleo com um sinal ou ≥ 3 sinais, respectivamente, foi maior que “média + 2 desvios padrão” dos controlos (Matsuyama, 1994). Os *cut-off* (limites) para a monossomia e polissomia foram de 32% e 3%, respectivamente. A avaliação de FISH foi realizada por um observador (S.P) e apenas em caso de dúvida foi requerido a opinião independente de um segundo observador (B.C).

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os testes de Qui-quadrado e exacto de Fisher para comparar as variáveis estudadas, quando apropriado. A sobrevivência livre de doença foi calculada segundo o método proposto por Kaplan e Meier sendo as diferenças observadas estudadas segundo o test log-rank. A recidiva e a progressão da doença foram definidas como o evento. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o apoio do programa específico SPSS 11.0 (SPSS[®] Inc.). Um valor de $p < 0,05$ foi aceite como estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS

Dos 62 casos estudados, 18 tumores (29,1%) eram confinados à mucosa da bexiga (pTa), 34 (54,8%) mostraram invasão da membrana basal (pT1a) e nos restantes 10 casos (16,1%) observou-se invasão da muscular da mucosa (pT1b).

Observou-se associação significativa ($p < 0,0001$) entre o estágio e o grau do tumor: 13 (72,2%) tumores pTa eram grau 1, a partir dos 34 UCCs pT1a, 28 (82,3%) são grau 2 e todos os tumores pT1b ($n=10$) são grau 2. A multifocalidade foi observada em 16 (25,8%) casos. No subgrupo tratado conservadoramente ($n=51$), 22 doentes (43,1%) experimentaram recidiva tumoral, destes 10 (45,4%) progrediram.

A imunoreactividade para a p53 (DO7 e Ab-240) e o status do *TP53* não se correlacionaram significativamente com o grau, o estágio do tumor, multifocalidade, idade e género (Tabela 1). Contudo, a presença de recidivas múltiplas associou-se significativamente com a deleção do *TP53* ($p=0,011$). Todos os doentes com idade inferior a 46 anos apresentaram alteração numérica no *TP53* (monossomia ou polissomia). Nos tumores pTa e/ou de grau 1, a deleção do gene estudado foi o evento mais prevalente, ao passo que nos tumores pT1 de grau 2 a polissomia do *TP53* foi a alteração mais vezes observada. A comparação entre a

imunorreatividade para a p53 e o status do *TP53* pelo teste de FISH revelou que todos os casos com duas cópias do gene eram p53 negativos (Ab-240) e os casos com alterações no gene *TP53* se relacionaram, na sua maioria, com a imunoeexpressão positiva da p53 (Ab-240) ($p=0,06$); não foi encontrada nenhuma associação significativa entre o status do *TP53* e a proteína p53 (DO7) (Tabela 2). As primeiras recidivas foram: DO7 positivas em 90,9% dos casos, Ab-240 positivas em 61,5% e em relação ao gene *TP53*, 29,4% apresentavam uma cópia do gene e 17,6% apresentavam três ou mais cópias.

Tabela 1 – Relação entre p53 (DO7), p53 (Ab-240) e status *TP53*, e as características clinicopatológicas, no carcinoma urotelial papilar superficial de bexiga.

	p53-DO7		p	p53-Ab 240		p	TP53			p
	-	+		-	+		Mon.	Dis.	Polis.	
Idade										
≤ 45	5	16	0,104	9	9	0,063	12	0	9	0,236
> 45	19	22		32	9		19	5	17	
Género										
Feminino	4	9	0,750	6	6	0,158	9	0	4	0,220
Masculino	20	29		35	12		22	5	22	
Estádio										
pT _a	7	11	0,985	11	4	0,708	10	2	6	0,639
pT ₁	17	27		30	14		21	3	20	
Grau										
G1	9	10	0,404	14	3	0,222	11	3	5	0,138
G2	15	28		27	15		20	2	21	
Multifocalidade										
Unifocal	17	29	0,767	32	12	0,517	23	4	19	0,949
Multifocal	7	9		9	6		8	1	7	
Recorrências										
nenhuma	9	20	0,632	20	7	0,169	8	4	17	0,011
uma	3	6		4	4		7	0	2	
duas ou mais	6	7		6	7		10	0	3	

Legenda: (+) expressão positiva; (-) expressão negativa; (Mon.) Monossomia; (Dis.) Dissomia; (Polis.) polissomia

Tabela 2 – Distribuição da imunorreatividade do p53 com os anticorpos DO7 e Ab-240, de acordo com o status do gene *TP53*, no carcinoma urotelial papilar superficial de bexiga.

	p53-DO7		p	p53-Ab 240		p
	-	+		-	+	
TP53						
monossomia	8	23	0,104	17	13	0,061
dissomia	3	2		5	0	
polissomia	13	13		19	13	

Legenda: (+) expressão positiva; (-) expressão negativa

A análise univariada (Kaplan-Meier) foi realizada com o intuito de avaliar a potencial associação entre o genótipo *TP53*, a imunoeexpressão da p53 e o prognóstico da doença (Tabela 3). O intervalo livre de recidiva aos 5 anos foi significativamente menor ($p=0,002$) nos casos com deleção de uma cópia do *TP53* (Figura 1). Estes casos associaram-se também a um intervalo livre de progressão aos 5 anos menor ($p=0,075$). Os casos p53 negativos

(Ab-240) tiveram uma sobrevivência livre de recidiva significativamente maior ($p=0,04$) quando comparado com os casos com imunoreactividade positiva para a p53 (Ab-240; Figura 2).

Tabela 3 – Análise univariada das variáveis de prognóstico para o intervalo livre de recidiva (RFS) e intervalo livre de progressão (PFS), no carcinoma urotelial papilar superficial de bexiga.

	5-anos RFS	p	5-anos PFS	p
Grau				
G1	32,0%	0,103	60,3%	0,545
G2	62,1%		76,7%	
Estádio				
pT _a	35,0%	0,344	60,0%	0,581
pT _{1a}	61,7%		80,7%	
pT _{1b}	0,0%		0,0%	
Multifocalidade				
Unifocal	56,8%	0,009	77,7%	0,009
Multifocal	36,3%		39,5%	
Tratamento				
RTU	48,2%	0,374	82,9%	0,571
RTU+Quimio	56,3%		64,9%	
TP53				
monossomia	23,1%	0,002	43,8%	0,075
dissomia	100,0%		100,0%	
polissomia	74,6%		90,4%	
p53 Ab-240				
negativo	58,7%	0,040	77,1%	0,361
positivo	30,1%		60,1%	
p53 D07				
negativo	36,7%	0,362	58,7%	0,145
positivo	58,9%		83,7%	

RTU – ressecção trans-uretral; Quimio – Quimioterapia intra-vesical

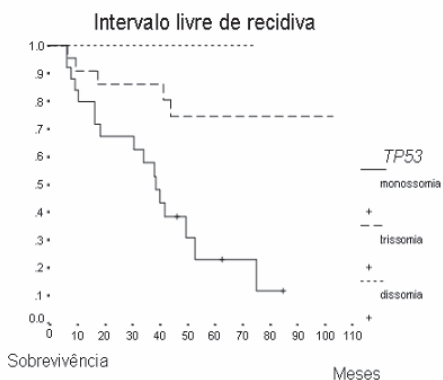


Figura 1 – Intervalo livre de recidiva em função do status do gene TP53 ($p=0,002$).

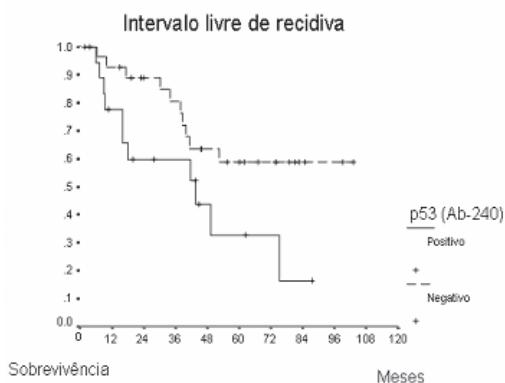


Figura 2 – Intervalo livre de recidiva em função da imunoreatividade para a p53 (Ab-240) ($p=0,04$).

4. DISCUSSÃO

Marcadores tumorais podem ser definidos como moléculas que indiciam a presença de tumores malignos. Estes marcadores são potencialmente usados na análise de prognóstico, predizendo a resposta ao tratamento e monitorizando os doentes (Duffy, 2001). A progressão do carcinoma da bexiga está correlacionada com a instabilidade genética e a acumulação de lesões genéticas envolvendo o gene *TP53* (Spruck, 1994; Kroft, 1994). A combinação da detecção imunohistoquímica da p53 e a análise molecular revelou que a acumulação desta proteína está associada à mutação do gene *TP53* (Esrig, 1993). As alterações deste gene no carcinoma da bexiga são mais frequentemente observadas nos tumores invasivos e estão associados a tumores de elevado grau (Baithun, 2001; Borkowska, 2007). Foi também encontrada uma correlação significativa entre a mutação do gene *TP53* em sedimentos urinários e a recidiva ou tumor residual (Sidransky, 1991; Sachs, 2000). Aneuploidia do cromossoma 17 (o local do gene *TP53*) associa-se à recidiva de carcinomas uroteliais superficiais e de carcinomas estadiados como T1b (Watters, 2000).

Neste estudo, a imunoposição da p53, obtida pelo anticorpo DO7, foi observada em 44,6% dos tumores primários e em 90,9% de tumores recorrentes. Não se encontrou associação entre a imunoposição da p53 (DO7) e o risco de recidiva ou progressão, contrariamente ao observado por Shariat *et al.* (Shariat, 2007). Nos casos em que não se constatou acumulação nuclear da p53, usualmente considerados como portadores do gene *TP53* não alterado, verificou-se que 33,3% eram monossômicos e 54,1% polissômicos, isto é, eram portadores de alterações numéricas do gene. Estes resultados sugerem que a avaliação da imunoreatividade para a p53, com recurso ao anticorpo DO7, não pode ser usado como um marcador de prognóstico viável nos carcinomas uroteliais da bexiga de baixo grau e superficiais, estando estes resultados de acordo com o estudo recente realizado por Dalbagni *et al.* em carcinomas da bexiga T1 recorrendo ao mesmo anticorpo (Dalbagni, 2007). Os tumores que apresentavam duas cópias do gene *TP53* revelaram-se p53 negativos (Ab-240). Nestes casos não foram observadas recidivas, todavia, a amostra era pequena ($n=4$). Os casos p53 positivos (Ab-240) tiveram um intervalo livre de recidiva significativamente menor. Este anticorpo reconhece a proteína associada à mutação do gene *TP53* no exão 7, frequente em UCCs superficiais (Abdel-Fattah, 1998). Os estudos de

Wright C. *et al.*, relativos à imunexpressão da p53 no cancro da bexiga usando o mesmo anticorpo (Ab-240), mostraram que tumores que invadem o músculo da bexiga tinham uma elevada imunorreatividade para o Ab-240, quando comparados com os carcinomas superficiais (Wright, 1991). Taxas de proliferação celular elevadas associaram-se à expressão da p53 utilizando o anticorpo Ab-240, em culturas de células uroteliais (Harney, 1995). Os nossos resultados sublinham que alterações do gene *TP53* em UCCs superficiais estão associadas a alterações numéricas do gene (monossomia ou polissomia) e a mutações do gene. Estes dados são concordantes com os encontrados por Erill *et al.* (Erill, 2004). Alguns autores mostraram que a deleção do cromossoma 17p13 em carcinoma urotelial superficial de baixo grau era baixa (6% e 17%) (Hartmann, 2000; Erill, 2004; respectivamente). Contudo, Shii *et al.*, que também usaram a técnica de FISH, observaram que células com monossomia do cromossoma 17 eram frequentes em carcinomas uroteliais de baixo grau e superficiais, porém não foi determinado o significado prognóstico destas alterações (Shii, 1997). Verificámos que 60,8% de casos com monossomia do gene *TP53* tinham um intervalo livre de recidiva significativamente menor. Foi também encontrada uma associação significativa entre a monossomia do gene *TP53* e recidivas multifocais, tendo havido, na sua maioria, simultaneamente uma progressão. Assim, podemos afirmar que os carcinomas uroteliais papilares e superficiais com um genótipo *TP53* similar ao usualmente observado em CIS e nos tumores de bexiga invasivos têm uma evolução coincidente. Em concordância com os nossos resultados, Chaturvedi *et al.* concluíram que nas fases pré-invasivas da neoplasia urotelial, a perda alélica multifocal do cromossoma 17 está predominantemente localizada nas regiões 17p12-13, 17q22-11 e 17q24-25. Mutações e perdas alélicas do gene *TP53* foram mapeadas em fases pré-invasivas da neoplasia urotelial; os resultados sugerem que durante o desenvolvimento e progressão da neoplasia urotelial, as alterações descritas constituem passos importantes na carcinogénese da bexiga (Chaturvedi, 1997).

Apesar do número relativamente pequeno de casos analisados, podemos concluir que a presença da monossomia *TP53* e/ou a acumulação nuclear da p53 revelada pelo anticorpo Ab-240 podem ser usados como marcadores de prognóstico nos carcinomas uroteliais e superficiais G1-G2 da bexiga.

5. CONCLUSÃO

O nosso estudo mostrou que os UCCs papilares e superficiais unifocais com deleção de uma cópia do gene *TP53* e/ou imunexpressão da p53 Ab-240 têm um intervalo livre de recidiva significativamente pequeno. Estes parâmetros podem ser marcadores biológicos de mau prognóstico.

Este artigo é o resultado de parte da tese de mestrado da autora, intitulada: "Alterações numéricas dos cromossomas 7, 8, 9 e 17, e dos genes TP53 e c-erbB2, nos carcinomas uroteliais da bexiga".

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH R, Challen C, Griffiths TR, *et al.* (1998). Alterations of *TP53* in microdissected transitional cell carcinoma of the human urinary bladder: high frequency of *TP53* accumulation in the absence of detected mutations is associated with poor prognosis. In: *Br J Cancer*. 77: 2230-2238.
- AJCC Cancer Staging Manual. (1997) American Joint Committee on Cancer. 5th ed. Philadelphia. Lippincott - Raven.
- BAITHUN SI, Naase M, Blanes A, Diaz-Cano SJ. (2001). Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. In: *Virchows Arch*. 438: 289-297.
- BORKOWSKA E, Binka-Kowalska A, Constantinou M, *et al.* (2007). *P53* mutations in urinary bladder cancer patients from central Poland. In: *J Appl Genet*. 48(2): 177-183.
- CHATURVEDI V, Li L, Hodges S, *et al.* (1997). Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 17 alterations in human urinary bladder neoplasia. In: *Oncogene*. 14: 2059-2070.
- DALBAGNI G, Parekh DJ, Ben-Porat L, *et al.* (2007). Prospective evaluation of p53 as a prognostic marker in T1 transitional cell carcinoma of the bladder. In: *BJU Int*. 99(2): 281-5.
- DUFFY MJ. (2001). Clinical uses of tumor markers: a critical review. In: *Crit Rev Clin Lab Sci*. 38: 225-262.
- EPSTEIN JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK and Bladder Consensus Committee. (1998) The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus of the Urinary Bladder. *Am J Surg Pathol*, 22:1435-1448.
- ERILL N, Colomer A, Verdú M, *et al.* (2004). Genetic and immunophenotype analyses of *TP53* in bladder cancer. In: *Diag Mol Pathol*. 13(4): 217-223.
- ESRIG D, Spruck CH, Nichols PW, *et al.* (1993). p53 nuclear protein correlates with mutations in p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. In: *Am J Pathol*. 143: 1389-1397.
- GAO J, Uchida T, Wang C, Jiang S, *et al.* (2000). Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. In: *Int J Oncol*. 16: 469-475.
- HARNEY J, Murphy DM, Jones M, Mothersill C. (1995). Expression of p53 in urothelial cell cultures from tumour-bearing and tumour-free patients. In: *Br J Cancer*. 71: 25-29.
- HARTMAN A, Rösner U, Schlake G, *et al.* (2000). Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. In: *Lab Invest*. 80: 709-718.
- HERR Hw. (2000). Tumor progression and survival of patients with high grade noninvasive papillary (TaG3) bladder tumors: 15-year outcome. In: *J Urol*. 163: 60-61.
- KNOWLES M. (1998). Molecular genetics of bladder cancer: pathways of development and progression. *Cancer Surveys – Bladder Cancer*, 31: 49-81.
- KROFT SH, Oyasu R. (1994). Urinary bladder cancer: mechanisms of development and progression. In: *Lab Invest*. 71: 158-174.
- LAMM DL, Blumenstein BA, Crissman JD, *et al.* (2000): Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent Ta, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. In: *J Urol*. 163: 1124-1129.
- LEE R, Droller MJ. (2000). The natural history of bladder cancer: implications for therapy. In: *Urol Clin North Am*. 27: 1-13.
- MATSUYAMA H, PanY, May E, *et al.* (1994). p53 deletion as a genetic marker in urothelial tumor by fluorescence in situ hybridization. In: *Cancer Res*. 54: 6057-6060.

- MOSTOFI FK, Sorbin LH, Torloni H.** (1973). Histological typing of urinary bladder tumours. International Classification of Tumours 10, Geneva, World Health Organization.
- OLUMI AF.** (2000). A critical analysis of the use of p53 as a maker for management of bladder cancer. In: *Urol Clin North Am.* 27: 75-82.
- RANGEL-LOPEZ A, Maldonado-Rodriguez R, Salcedo-Vargas M, et al.** (2005). Low density DNA microarray for detection of most frequent *TP53* missense point mutations. In: *BMC Biotechnology.* 5:8.
- SACHS MD, Schlechte H, Lenk VS, et al.** (2000). Genetic analysis of *TP53* from urine sediment as a tool for diagnosing recurrence and residual of bladder carcinoma. In: *Eur Urol.* 38: 426-433.
- SHARIAT S, Ashfaq R, Sagalowsky A, Lotan Y.** (2007). Predictive value of cell cycle biomarkers in nonmuscle invasive bladder transitional cell carcinoma. In: *J Urol.* 177: 481-487.
- SHII N, Ariyoshi A, Kinjo M, Sasaki K.** (1997). Detection of numerical chromosomal aberrations in bladder carcinomas by florescence in situ hybridization. In: *J Urol Pathol.* 7: 21-32.
- SIDRANSKY D, Von Eschenbach A, Tsai YC, et al.** (1991). Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. In: *Science.* 252: 706-708.
- SPRUK CH, Ohneseit PF, Zulueta M, et al.** (1994). Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. In: *Cancer Res.* 54: 784-788.
- VOGELSTEIN B, Lane D, Levine AJ.** (2000). Surfing the p53 network. In: *Nature,* 408: 307-310.
- WATTERS AD, Ballantyne SA, Going JJ, et al.** (2000). Aneusomy of chromosomes 7 and 17 predicts the recurrence of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. In: *Br J Urol Int.* 85: 42-47.
- WRIGHT C, Mellon, K, Johnston P, et al.** (1991). Expression of mutant p53, c-erbB2, and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. In: *Br J Cancer.* 63: 967-970.
- ZIEGER K, Wolf H, Olsen PR, Hojgaard K.** (2000). Long-term follow-up of noninvasive bladder tumours (stage Ta): recurrence and progression. In: *Br J Urol Int.* 85: 824-828.