

Valeur pronostique des marqueurs d'agressivité des tumeurs vésicales évalués par immunohistochimie.

Abir Chaabane *, Issam M'Sakni *, Manel Yahia*, Fethi Bougrine *, Besma Laabidi *, Ramzi Khiari **, Samir Ghozzi**, Naoufel Berraies**, Ammar Bouziani*.

* Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques. - ** Service d'Urologie.
Hôpital Militaire Principal d'Instruction de Tunis, Tunis, Tunisie.

A. Chaabane, I. M'Sakni, M. Yahia, F. Bougrine, B. Laabidi, R. Khiari, S. Ghozzi, N. Berraies, A. Bouziani.

A. Chaabane, I. M'Sakni, M. Yahia, F. Bougrine, B. Laabidi, R. Khiari, S. Ghozzi, N. Berraies, A. Bouziani.

Valeur pronostique des marqueurs d'agressivité des tumeurs vésicales évalués par immunohistochimie.

Prognostic value of markers of aggressiveness of urinary bladder tumours evaluated by immunohistochemistry

LA TUNISIE MEDICALE - 2014 ; Vol 92 (n°03) : 208-213

LA TUNISIE MEDICALE - 2014 ; Vol 92 (n°03) : 208-213

R É S U M É

Prérequis : L'étude de certains marqueurs immunohistochimiques permet une évaluation objective et reproductible du pronostic des tumeurs de la vessie.

But : Etudier l'intérêt pronostique de l'expression des marqueurs immunohistochimiques suivants dans les tumeurs vésicales : Proliférant Cell Nuclear Antigen (PCNA), l'antigène Ki67 (MIB 1), le proto-oncogène C-erb B2, le gène suppresseur de tumeur p53, le récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGF-R), le gène suppresseur de l'apoptose bcl2, l'antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) et l'Antigène Membranaire Epithélial (EMA).

Méthodes: Etude d'une série rétrospective de 30 patients ayant des tumeurs vésicales.

Résultats: L'expression de PCNA avec une valeur seuil de positivité fixée à 14% est corrélée à la récurrence précoce (P= 0.010). En outre, l'expression de PCNA avec une valeur seuil de positivité fixée à 1% est corrélée au stade tumoral (P= 0.003). L'expression de MIB1 avec une valeur seuil de positivité fixée à 47% est corrélée à la récurrence précoce (P= 0.010). Par ailleurs, l'expression de MIB1 avec une valeur seuil de positivité fixée à 47% est corrélée à la progression tumorale en stade et/ou en grade (P= 0.007). L'expression de C-erbB2 avec une valeur seuil de positivité fixée à 28 % est corrélée au grade tumoral (P= 0.007). Les autres anticorps n'ont pas démontré une valeur pronostique.

Conclusion: Les marqueurs Mib1 et PCNA étant corrélés à la récurrence précoce, ils pourraient intervenir dans la décision du rythme des contrôles endoscopiques des patients. La corrélation de C-erbB2 avec le grade tumoral pourrait servir à mieux grader les tumeurs vésicales.

S U M M A R Y

Background: The study of some immunohistochemical markers provides an objective and reproducible prognostic evaluation of urinary bladder tumour.

Aims: study the expression of the following immunohistochemical markers in Tumours of the bladder: Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), Ki67 antigen (MIB1), the C-erbB2 proto- antigen, the tumor suppressor gene p53, the receptor for epidermal growth factor (EGF-R), the apoptosis suppressor gene bcl2, the carcinoembryonic antigen (CEA) and epithelial membrane antigen (EMA).

Methods: Study of retrospective series of 30 patients having tumours of the urinary bladder.

Results: The expression of PCNA with a cut-off value of 14% is correlated with recurrence (P = 0.010). The expression of PCNA with a cut-off value of 1% is correlated with tumour stage (P = 0.003). The expression of MIB1 with a cut-off value of 47% is correlated with recurrence (P = 0.010). The expression of MIB1 with a cut-off value of 47% is correlated with the tumour progression in stage and/or in grade (P = 0.007). The expression of C-erbB2 with a cut-off value of 28% is correlated in the tumour grade (P = 0.007). The other antibodies didn't demonstrate a prognostic value.

Conclusion: Mib1 and PCNA being correlated with recurrence, they can be useful with the decision of the rhythm of the endoscopy. The correlation of C-erbB2 with the tumour grade could serve to better graduating bladder tumours.

M o t s - c l é s

Tumeur de vessie, immunohistochimie, pronostic.

Key - w o r d s

Urinary bladder tumour, immunohistochemistry, prognosis.

Le cancer de la vessie est un des cancers les plus fréquents chez l'homme [1, 2]. En Tunisie, il représente le premier cancer urologique avant celui de la prostate [3]. L'évolution des tumeurs vésicales (TV) est peu prévisible. Les facteurs prédictifs de récurrence et de progression tumorale sont endoscopique (multifocalité et taille tumorale) et anatomopathologique (grade et stade tumoraux). Cependant l'hétérogénéité concernant la récurrence, la progression et la réponse aux traitements pour les tumeurs ayant les mêmes critères classiques de pronostic rend compte de l'insuffisance des paramètres actuellement utilisés, qui sont peu reproductibles et sujets à des variations inter et intra observateur. Des travaux récents ont souligné l'intérêt de certains marqueurs immunohistochimiques de prolifération cellulaire et de l'apoptose dans la détermination du potentiel évolutif des TV [4,5].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 /Critères d'inclusion des patients dans l'étude :

L'étude est rétrospective portant sur 30 cas de TV diagnostiqués entre 1994 et 1998. Nous n'avons inclus que les patients contrôlés régulièrement par voie endoscopique. Les données cliniques et histopathologiques ont été collectées et analysées statistiquement. La classification histologique de l'organisation mondiale de santé (OMS) 2002 et la classification TNM 1997 ont été utilisées.

2 /Etude immunohistochimique :

Tous les prélèvements étudiés ont été fixés dans du formol tamponné à 10 % ou le liquide de Bouin et inclus en paraffine. Les blocs de paraffine ont été coupés à 5 µm et les lames colorées selon les techniques standards à l'Hématéine-Eosine. La méthode d'immunomarquage: Elle est basée sur la technique d'immunoperoxydase en trois couches utilisant un kit DAKO-LSAB avec révélation par l'AEC (3 Arnino-Ethyl-Carbazole). L'évaluation de l'immunomarquage : Pour les tumeurs papillaires, nous avons sélectionné les zones proches de la membrane basale (riches en cellules proliférantes) et les zones situées immédiatement au dessus. Pour les tumeurs invasives, les cellules en prolifération sont uniformément réparties de manière diffuse au sein de la tumeur. Nous avons sélectionné les zones les plus intensément marquées.

Une évaluation quantitative est adoptée pour les marqueurs suivants PCNA, Ki-67, bcl2, c-erbB2, P53 et EGFR en calculant un index qui est égal au nombre de noyaux positifs divisé par le nombre total de noyaux des cellules comptées. L'index est déterminé après comptage dans chaque cas de 400 noyaux.

Une évaluation subjective est adoptée pour EMA en estimant l'intensité et la répartition de l'immunomarquage.

Une évaluation de la répartition topographique de l'ACE a été réalisée (luminale, cytoplasmique apicale ou cytoplasmique diffuse).

Etude statistique : Le seuil de positivité des marqueurs étudiés a été déterminé en considérant la médiane des pourcentages

trouvés et en comparant ce seuil au chiffre obtenu par une courbe de ROC (Receiver Operating Curve) pour choisir le pourcentage avec la meilleure sensibilité et spécificité de l'expression du marqueur.

Un marquage immunohistochimique est dit positif si le pourcentage exprimé est supérieur ou égal au chiffre seuil calculé. Dans le cas contraire, ce marquage est considéré comme négatif. Les valeurs seuil de positivité sont 25% pour p53, 11% pour bcl2 et EGFR, 47% pour Mib1, 14% pour PCNA en corrélation avec la récurrence, 1% pour PCNA en corrélation avec le stade tumoral.

Les tests de chi-deux, de Mann whitney et de Kruskal Wallis ont été utilisés pour rechercher une corrélation entre les différents marqueurs immunohistochimiques et les paramètres étudiés.

La corrélation est significative pour un taux de probabilité supérieur à 95%, soit un risque d'erreur inférieur à 5% ($p=0,05$).

RÉSULTAT

1/Caractéristiques clinico-pathologiques

Notre étude a intéressé 27 hommes (90%) et 3 femmes (10%). Le sexe ration était de 9/1. L'âge moyen était de 68 ans avec des extrêmes allant de 38 ans à 84 ans. La symptomatologie était dominée par l'hématurie (86,6%). L'endoscopie a montré que 90% des tumeurs étudiées étaient unifocales. Les tumeurs avaient une taille variant de 0.5 à 7cm avec une moyenne de 2.6cm. 82.6% des tumeurs étaient de type papillaire, 8.7% étaient solides et les 8.7% restant étaient mixtes. L'aspect sessile a été retrouvé dans 68.1% des cas ; l'aspect pédiculé a été retrouvé dans 31.9% des cas. Les tumeurs se développaient préférentiellement au niveau des faces latérales dans 42.4% des cas et au niveau du trigone dans 30.8% des cas.

D'un point de vue anatomopathologique, l'architecture papillaire était présente dans 24 cas, le reste de cas était d'architecture massive. Ces TV ont été classées selon la classification de l'OMS de 2002 en tumeurs urothéliales de faible potentiel de malignité (NUFPM) (10%), carcinomes urothéliaux de bas grade (CUBG) (56,7%) et carcinomes urothéliaux de haut grade (CUGH) (33,3%). Le pourcentage des tumeurs de stade pTa était de 20%, celui des tumeurs de stade pT1 était de 56,6% et celui des tumeurs de stade pT2 était de 23.4%. 81.9% des tumeurs ont récidivé au moins une fois.

Le taux de progression en stade et/ ou en grade tumoral a été estimé à 19.2%. Seulement deux malades (6.6%) ont présenté des métastases. Le premier malade avait des métastases hépatiques et péritonéales ; le deuxième malade avait une métastase pulmonaire.

2/ Analyse des données de l'étude immunohistochimique

L'étude de la valeur pronostique des différents marqueurs immunohistochimiques utilisés a montré que l'expression de PCNA est corrélée à la récurrence précoce ($p=0.01$) avec une valeur seuil de positivité fixé à 14% et au stade tumoral ($p=0.003$) avec une valeur seuil de positivité fixé à 1% (tableau 1 et 2). Le risque de récurrence précoce est multiplié par 5,7

lorsque PCNA marque plus de 14% des cellules tumorales (Risque relatif=5,72).

Tableau 1 : Tableau croisé PCNA x récurrence précoce

PCNA	Récurrence<1an		Total
	Non	Oui	
Négatif	16	2	18
Positif	4	7	11
Total	20	9	29

P= 0.010 : Significatif

Tableau 2 : Tableau croisé PCNA x stade tumoral

PCNA	Stade tumoral		Total
	pT1+pT2	pT3	
Positif	23	2	25
Négatif	1	4	5
Total	24	6	30

P= 0.003 : Significatif

L'expression de Mib1 est significativement associée à la récurrence précoce (p=0.010) avec une valeur seuil de positivité fixé à 47% (tableau 3), et à la progression tumorale en stade et/ ou en grade (p=0.007) avec une valeur seuil de positivité fixé à 47% (tableau 4). L'expression de c-erbB2 avec une valeur seuil de positivité fixé à 28% est corrélée au grade tumoral (p=0.007) (tableau 5). Concernant l'EMA aucune relation entre l'intensité et la répartition du marquage et le grade et/ ou le stade n'a été observée. La valeur pronostique des autres marqueurs n'a pas été prouvée.

Tableau 3 : Tableau croisé Mib1 x récurrence précoce

Mib1	Récurrence<1an		Total
	Non	Oui	
Négatif	16	2	18
Positif	4	7	11
Total	20	9	29

P= 0.010 : Significatif

Tableau 4 : Tableau croisé Mib1 x progression tumorale

Mib1	Progression tumorale		Total
	Non	Oui	
Négatif	15	0	15
Positif	6	5	11
Total	21	5	26

P= 0.007 : Significatif

Tableau 5 : Tableau croisé c-erbB2 x grade tumoral

c-erbB2	grade tumoral		Total
	CUBG+CUHG	NUFPM	
Positif	19	0	19
Négatif	8	3	11
Total	27	3	30

DISCUSSION

L'évolution des TV est peu prévisible. Elle va de la guérison définitive après simple résection à la récurrence avec progression tumorale [6]. Cette évolution dépend classiquement des facteurs cliniques (l'âge et le tabagisme), endoscopiques, et histopathologiques.

Le rôle du tabagisme dans la récurrence et la progression des TV reste incertain [7]. Certains auteurs ont confirmé que les tumeurs multifocales présentent un risque plus élevé de progression que les tumeurs unifocales [8, 9] ; d'autres études n'ont pas été en mesure de confirmer ce résultat [10,11]. La taille tumorale dépassant 3cm est un facteur prédictif de récurrence [12]; d'autres études n'ont pas trouvé une corrélation statistiquement significative entre la taille tumorale et la récurrence [9]. La valeur prédictive de récurrence et/ ou de progression tumorale du mode de croissance (solide ou papillaire) est également controversée [13,14].

Le stade et le grade tumoral des TV restent des éléments majeurs pour définir le pronostic. Cependant, il est parfois difficile d'identifier une infiltration du chorion ou du muscle vésical. De plus, l'évaluation du grade tumoral est subjective et non reproductible. L'analyse de certains marqueurs immunohistochimiques permettrait de compléter utilement l'analyse morphologique conventionnelle. L'évaluation quantitative immunohistochimique permet une interprétation plus objective et reproductible de l'analyse morphologique.

Expression du PCNA :

Dans la littérature, des études ont montré que l'expression du PCNA est corrélée au grade et au stade tumoral [15, 16], ainsi qu'au potentiel de récurrence [17]. Korkolopoulou et al ont montré qu'un index PCNA élevé était corrélé à une diminution de la survie globale [17]. Kuezyk et al et Hattori et al ont trouvé une corrélation entre l'expression de PCNA et la progression tumorale, mais sans corrélation avec la récurrence [18, 19]. Le présent travail confirme que la surexpression de PCNA est corrélée au stade tumoral et qu'elle prédit la récurrence précoce. Il montre que le risque de récurrence précoce est multiplié par 5,7 lorsque PCNA est positif. En outre, la mesure de l'index PCNA peut être un moyen d'évaluer l'efficacité thérapeutique, puisque il diminue significativement après une chimiothérapie systémique pour TV [20].

Expression de l'antigène Mib1 :

La plupart des études ont montré que l'expression du marqueur Ki-67 est corrélée au grade des tumeurs vésicales [21, 22,23], à la récurrence et la progression tumorale [10, 11, 23]. En ce qui concerne le stade tumoral, certains auteurs ont trouvé une corrélation entre la surexpression de ki-67 et le stade d'infiltration de la paroi vésicale [21, 22]. D'autres auteurs n'ont pas été en mesure de prouver cette corrélation [23]. Notre travail confirme cette quasi –unanimité concernant l'intérêt pronostique de Ki-67 en démontrant que la surexpression est fortement corrélée à la progression et à la récurrence précoce des

TV. Signalons enfin que pour les tumeurs de stade pTa, le mode de distribution de l'immunomarquage par ki-67 pourrait avoir un intérêt pronostique. En effet, Fontana et al [24] opposent les tumeurs dont l'immunomarquage prédomine au niveau de la base d'implantation de la tumeur à fort risque de récurrence, aux tumeurs où l'immunomarquage se répartit préférentiellement dans la partie végétante, à faible risque de récurrence. Dans notre série, on n'a pas observé une corrélation entre la répartition de l'immunomarquage de Mib1 et le risque de récurrence précoce.

Expression du gène c-erbB2 :

L'expression de c-erbB2 est fréquemment retrouvée dans les TV. Cependant la signification et la valeur pronostique du gène c-erbB2 restent discutées. Certaines études ont retrouvé que la surexpression de c-erbB2 est associée au risque accru de progression de la maladie et au développement de métastases à distance [25]. D'autres études ont montré que le risque de récurrence est corrélé à la surexpression de c-erbB2 [26,27]. D'autres encore ont montré que l'amplification de c-erbB2 est corrélée au stade et/ ou au grade tumoral [28,29]. Dans certaines études, il n'est pas mis en évidence de relation significative entre le taux d'expression et le stade tumoral et/ ou le grade histopathologique [26, 25]. Ces résultats contradictoires semblent être dus à la difficulté de l'évaluation de l'immunomarquage qui reste dépendante des techniques utilisées. Dans notre série, la surexpression du gène c-erbB2 avec une valeur seuil fixée à 28% est associée à un haut grade tumoral. Ainsi l'immunomarquage par c-erbB2 pourrait aider le pathologiste à mieux grader les TV. Le grade II, qui regroupe des tumeurs hétérogènes, peut être subdivisé selon la classification de l'OMS de 1973 en grade II de bon pronostic avec c-erbB2 négatif et en grade II de mauvais pronostic avec c-erbB2 positif.

Expression de p53, bcl2, EGFR, EMA, et ACE :

Les données de la littérature sont discordantes en ce qui concerne l'expression de p53 en fonction du grade et du stade tumoral. Le proto-oncogène bcl2 est un élément de régulation de l'apoptose en bloquant la mort cellulaire sans affecter la prolifération [30, 31,32]. Vollmer et al [33] a souligné l'importance de l'interprétation de l'expression de bcl2 en association avec celle de P53. Cependant, c'est le résultat de l'expression de p53 qui prime [34] d'autant plus que le marqueur bcl2 semble être non corrélé au grade ou au stade tumoral [32]. Dans notre étude seulement 7 tumeurs parmi les 30 étudiées (23,3%) ont exprimé bcl2.

EGF-R est un récepteur membranaire pour des facteurs de croissance EGF et TGF alpha qui est le principal facteur impliqué dans la carcinogenèse vésicale. En pathologie humaine, il existe une surexpression diffuse d'EGF-R dans 40% des tumeurs vésicales [35]. Korkolopoulou a prouvé une relation significative entre la surexpression d'EGF-R et la diminution de la survie [17]. D'autres études ont trouvé que cette surexpression est corrélée à d'autres paramètres pronostiques : aneuploidie, indice de prolifération, expression de la protéine p53 [28]. D'après Chow et al, la surexpression

d'EGF-R n'a de valeur pronostique que s'il est associé à une surexpression de c-erbB2 [27]. Contrairement aux travaux suscités, dans notre série la surexpression d'EGF-R n'a pas de valeur pronostique.

L'EMA est un marqueur de différenciation épithéliale. Dans l'urothélium normal, l'EMA est exprimé sur le versant luminal de la membrane cytoplasmique et plus discrètement au niveau du cytoplasme des cellules superficielles. Certains travaux, ont montré que dans les tumeurs superficielles, l'aspect est proche de celui de l'épithélium normal. Dans les tumeurs de haut grade, infiltrantes, le marquage devient, intense, hétérogène membranaire et cytoplasmique avec un aspect en mosaïque au sein de la tumeur [36]. Dans notre étude aucune relation entre l'intensité et la répartition du marquage à l'EMA et le grade et/ ou le stade n'a été observée. Ces auteurs ont expliqué que la modification de l'expression de l'EMA est liée à la modification du comportement biologique des cellules et que cette expression est dépourvue de valeur pronostique [36].

L'ACE appartient à la superfamille des gènes des immunoglobulines. La plupart des auteurs rapportent une corrélation entre le taux d'ACE urinaire et le grade et/ ou le stade tumoral [37]. Les études intéressant l'expression de l'ACE révélée par immunohistochimie sont contradictoires. Dans notre étude, la positivité de l'ACE et son type (luminal, apical ou cytoplasmique) sont dépourvus de valeur pronostique.

CONCLUSION

A travers cette étude, on pourrait mieux classer les TV et optimiser la prise en charge des malades. En effet, les marqueurs Mib1 et PCNA étant corrélés à la récurrence précoce, ils pourraient intervenir dans la décision du rythme des contrôles endoscopiques des patients. La corrélation de c-erbB2 avec le grade tumoral pourrait servir en pratique quotidienne à mieux grader les TV. Nos résultats sont concordants avec la plupart des études s'intéressant au sujet mais sont discordants avec quelques autres. Nous pensons que la discordance entre les résultats des différentes études est principalement due à un manque de standardisation des techniques immunohistochimiques qui concernent à la fois le choix du clone d'anticorps, la procédure de la technique utilisée et la détermination de la valeur seuil de positivité.

Figure 1 : Surexpression de Mib1 par une TV ayant récidivé 2 fois en une année passant d'un stade pta à un stade pt1 (Mib1 X 400).

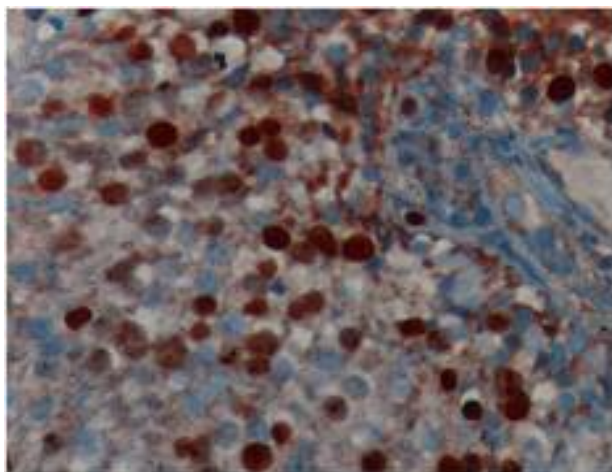
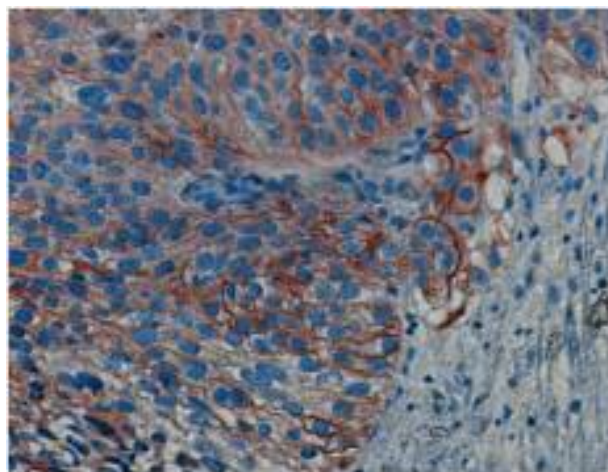


Figure2 : Surexpression de C-erbB2 par une TV de haut grade (C-erbB2 X 400)



References

1. Uchida T, Minei S, Gao JP et al. Clinical significance of p53, MDM2 and bcl2 expression in transitional cell carcinoma of the bladder. *Oncol Rep* 2002; 9: 253-9.
2. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn TA. World health organisation classification of tumours. Lyon: IARC Press 2004: 89-119.
3. Maalej M, Mosbah AF. Cancérologie pratique- Cancers de la vessie. Tunis : Centre des publications universitaires 1999: 345-53.
4. Molinié V, Ionchamps E, Ouzana D, Lebret T. Tumeurs de vessie et marqueurs moléculaires. *Ann Pathol* 2003; 23: 306-31.
5. Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, et al. Current Concepts in Biomarker Technology for Bladder Cancers. In *Clin Chem* 2000 ; 46: 595-605.
6. Gattegno B, Chopin D. Histoire naturelle des tumeurs superficielles de vessie. *Prog Urol* 2001; 11: 963- 90.
7. Aveyard P, Adab P, Cheng K K, et al. Does smoking status influence the prognosis of bladder cancer? A systematic review. *BJU Int* 2002; 90: 228-239.
8. Ali-El-Dein B, Sarhan O, Hinev A, et al. Superficial bladder tumors: analysis of prognostic factors and construction of a predictive index. *BJU Int* 2003 ; 92: 393-399.
9. Sebe P, Lebret T, Molinie V, et al. Tumeurs superficielles de vessie de grade G2 : récidive, progression, pronostic. *Prog Urol* 2003; 13: 608-612.
10. Santos LL, Amaro T, Pereira SA, et al. Expression of cell-cycle regulatory proteins and their prognostic value in superficial low-grade urothelial cell carcinoma of the bladder. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 74-80.
11. Bol MGW, Baak JPA, Van Diermen B, et al. Proliferation markers and DNA content analysis in urinary bladder TaT1 urothelial cell carcinomas: identification of subgroups with low and high stage progression risks. *Journal of clinical pathology* 2003; 56: 447-52.
12. Rodríguez-Alonso A, Pita-Fernández S, González-Carrero J. p53 and ki67 expression as prognostic factors for cancer-related survival in stage T1 transitional cell bladder carcinoma. *Eur Urol* 2002; 41: 182-9.
13. Billerey C, Sibony M. Les tumeurs urothéliales dites« superficielles » de la vessie. Quelle classification en 2003 ? *Ann Pathol* 2003; 23: 21-33.
14. Rey A, Lara PC, Redondo E, et al. Overexpression of p53 in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. Relation to tumor proliferation and survival. *Cancer* 1997; 79: 2178-2185.
15. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Dimopoulos D, et al. p53 and c-jun expression in urinary bladder transitional cell carcinoma: correlation with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) histological grade and clinical stage. *Eur Urol* 1997; 31: 464-71.
16. Chen L, Wang X, Mei H, et al. Apoptosis and expression of PCNA in superficial transitional cell bladder cancer as related to recurrence. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1998; 36: 484-6.
17. Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kapralos P, et al. The role of p53, MDM2 and c-erb B2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in prognosis of urinary bladder cancer. *Pathol Res Pract* 1997; 193: 767-75.
18. Kuezyk MA, Serth J, Bokemeyer C, et al. Value of the proliferation status(PCNA) and p53 immunohistochemistry as a prognostic factor for the clinical course of superficial cancer of the urinary bladder. *Urologe A* 1995; 34: 146-52.
19. Hattori K, Uchida K, Akaza H, et al. Proliferating cell nuclear antigen cyclin in human transitional cell carcinoma. *Br J Urol* 1995; 75: 162-6.
20. Y Nagase, N Moriyama, S Kurimoto, et al. Histochemical expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) for pre

- and post chemotherapeutic bladder cancer. *Nihon Hinyōkika Gakkai zasshi* 1995; 86: 985-90.
21. Compérat E, Camparo P, Haus R, et al. Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases. *European Society of Pathology* 2006; 448: 319-324.
 22. Matsumoto M, Ohtsuki Y, Ochii K, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 protein expression in urothelial carcinoma of the urinary bladder, exhibiting no association with low-grade and/or non-invasive lesions. *Oncol Rep* 2004; 12: 967-71.
 23. Wu TT, Chen JH, Lee YH, Huang JK. The role of BCL-2, p53 and Ki-67 index in predicting tumor recurrence for low grade superficial transitional cell bladder carcinoma. *The Journal of Urology* 2000; 163: 758-760.
 24. Fontana D, Bellina M, Gubetta L, et al. Monoclonal antibody Ki-67 in the study of the proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol* 1992; 148: 1149-51.
 25. Moch H, Sauter G, Mihatsch MJ, et al. p53 but not erbB-2 expression is associated with rapid tumor proliferation in urinary bladder cancer. *Hum Pathol* 1994; 25: 1346-51.
 26. [26] Lee SE, Chow NH, Chi YC, et al. Expression of c-erbB-2 protein in normal and neoplastic urothelium: lack of adverse prognostic effect in human urinary bladder cancer. *Anticancer Res* 1994; 14: 1317-24.
 27. Carpenter CD, Ingraham HA, Cochet C, et al. Structural analysis of the transmembrane domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 5750-5.
 28. Wright C, Thomas D, Mellon K, et al. Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with Ki67 index. *Br J Urol* 1995; 75: 173-9.
 29. Asamoto M, Hasegawa R, Masuko T, et al. Immunohistochemical analysis of c-erbB-2 oncogene product and epidermal growth factor receptor expression in human urinary bladder carcinomas. *Acta Pathol Jpn* 1990; 40: 322-6.
 30. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G, et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; 77: 255-264.
 31. J. Diebold et al., "BCL-2 EXPRESSION, P53 ACCUMULATION, AND APOPTOSIS IN OVARIAN CARCINOMAS", *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 341-349.
 32. Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, et al. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol* 1998; 29: 146-54.
 33. Vollmer RT, Humphrey PA, Swanson PE, et al. Invasion of the bladder by transitional cell carcinoma: its relation to histologic grade and expression of p53, MiB-1, c-erb B-2, epidermal growth factor receptor, and bcl-2. *Cancer* 1998; 82: 715-723.
 34. Li B, Kanamaru H, Noriki S, et al. Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res* 1998; 26: 235-41.
 35. Nguyen PL, Swanson PE, Jaszcz W, et al. Expression of EGFR in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol* 1994 ; 101: 166-76.
 36. Sánchez-Fernández de Sevilla MC, Morell-Quadreny L, Gil-Salom M, et al. Behavior of epithelial differentiation antigens (carcinoembryonic antigen, epithelial membrane antigen, keratin and cytokeratin) in transitional cell carcinomas of the bladder. *Urol Int* 1992; 48: 14-9.
 37. Jautzke G, Altenaehr E. Immunohistochemical demonstration of carcinoembryonic antigen (CEA) and its correlation with grading and staging on tissue sections of urinary bladder carcinomas. *Cancer* 1982; 50: 2052-6.