

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**GANHOS E PERDAS GENÔMICAS EM MOMENTOS  
SUCESSIVOS DO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA  
HUMANA**

**MERIELEN GARCIA NASCIMENTO E PONTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Patologia da Faculdade de  
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual  
Paulista - UNESP para obtenção do título de  
Doutor em Patologia

**Botucatu - SP**

**2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**

**GANHOS E PERDAS GENÔMICAS EM MOMENTOS  
SUCESSIVOS DO CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA  
HUMANA**

**Doutoranda: Merielen Garcia Nascimento e Pontes**  
**Orientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo**  
**Co-orientadora: Prof. Dra. Silvia Regina Rogatto**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Mestre em Patologia

**Botucatu - SP**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Nascimento e Pontes, Merielen Garcia.

Ganhos e perdas genômicas em momentos sucessivos do carcinoma urotelial de bexiga humana / Merielen Garcia Nascimento e Pontes. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: João Lauro Viana de Camargo

Co-orientadora: Silvia Regina Rogatto

Capes: 40100006

1. Bexiga – Doenças - Câncer.

Palavras-chave: Carcinoma urotelial de bexiga humana; HR-CGH; FISH; p53.

*Ao meu marido Edson Ricardo Pontes (Anjo) pelo seu amor incondicional, pela sua eterna alegria e pelo seu ombro amigo nas horas difíceis.*

*Obrigada por existir!*

*“Fundamental é mesmo o amor. É impossível ser feliz sozinho”*

*Vinícius de Moraes*

*Aos meus pais Eliane e Wagner por me permitirem voar tão alto, mesmo  
sofrendo com a dor da saudade. Pelo exemplo de vida e de total dedicação na  
construção da minha felicidade. Com vocês aprendi o que é o amor  
incondicional. Obrigada!*

*Amo minha família, cada um de vocês.  
Mesmo distantes, conseguimos manter a chama desse amor  
O amor que nos une a cada dia, nos dando força para viver.*

*Nos dando força a cada caminhada,  
Pois onde quer que vamos, sabemos que jamais estamos sozinhos.  
Os caminhos são diferentes, mas quando precisamos - ali estamos nós!  
Em qualquer situação, acolhendo uns aos outros  
Semeando o amor de Deus.*

*Autor Desconhecido*

*Ao Dr. João Lauro Viana de Camargo pelo exemplo de vida, caráter,  
competência e amizade. Professor exímio sempre disposto a ensinar e também a  
aprender.*

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará  
assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que  
adquira um sentimento, senso prático daquilo que vale a pena ser  
empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”*

*Albert Einstein*

*À Prof. Dra. Sílvia Regina Rogatto pelos seus ensinamentos, pelo seu comprometimento com a ciência e, por sempre estar disposta a ajudar.*

*Aos amigos do anexo João Francisco, Marize, Meire, Tony e Renata pelos anos de convivência e pelos momentos de descontração e amizade. Vocês sempre estarão nas minhas melhores lembranças.*

*Às secretárias Tânia e Vânia pela amizade e o auxílio nos momentos de sufoco.*

*À Luciana Sculdeletti e Bruno Castaldi pelo apoio e dedicação na execução de nossos trabalhos.*

*Aos amigos do TOXICAM Alexandre, Ana Paula, Bianca, Carla, Gabrielli, Mitscheli, , Shadia, Viviane, Paulo e Mara que de forma direta ou indireta colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos amigos que já passaram pelo TOXICAM e que sempre deixarão saudades, principalmente, Clarissa, Marina e Patrícia.*

*À secretária Cristina Dorico por dividir comigo os momentos de angústia e multiplicar os de alegria.*

*À amiga Iza por sempre fazer dos nossos problemas o dela e permanecer ao nosso lado até que eles estejam resolvidos.*

*Às Dra Mariângela Esther Alencar Marques e Dra Gisele Alborghetti Nai por me proporcionarem livre acesso ao software de análise da técnica de FISH.*

*Às coordenadoras do Curso do Pós-Graduação em Patologia, Dra Denise Fechio e Dra. Márcia Guimarães da Silva.*

*À amigas Renatinha e Ancelia pela amizade verdadeira e sincera.*

*À amiga Claudinha pelo seu exemplo de dedicação e amizade.*

*Aos amigos do Laboratório NeoGene, principalmente à Renata, Rodrigo, Sandra e Sara com que tive um maior convívio.*

*À Angela, Angélica, Cido, Larissa pela acolhida nessa adorável família.*

*À tia Taninha, tio Rogério, Dério, tia Lucinha, tio Ayrton, Nega, Eveline, Neneu e pequeno Heitor e todos os meus familiares que, apesar da distância, sempre estiveram presentes na minha vida.*

*Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia pela amizade.*

*Aos funcionários da Endoscopia, docentes e residentes da Urologia e pacientes envolvidos neste trabalho. Nada disso seria possível sem o auxílio de vocês.*

*Aos funcionários da seção de Pós-graduação pelo comprometimento.*

*Ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP), especialmente Liciano Vaz de Arruda Silveira pela realização dos testes estatísticos.*

*E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.*



*Este trabalho foi realizado como auxílio financeiro das seguintes instituições:*

*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (05/58917-0 e 06/55634-0).*

*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (304690/2006-6).*

*Centro de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana – TOXICAM, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.*

## Índice geral

<b>Revisão da literatura</b> .....	1
Tumores uroteliais de bexiga e alterações genéticas.....	1
Considerações metodológicas.....	5
Microdissecção a laser.....	5
Hibridação genômica comparative de alta resolução .....	6
Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> .....	6
Alterações genômicas no UBC.....	7
<b>Referências</b> .....	10
<b>Manuscrito</b> .....	16
Abstract.....	17
Introduction .....	18
Materials and methods.....	19
Patients and tumor specimens.....	19
High Resolution - Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH) .....	20
Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH) .....	21
p53 evaluation.....	22
Results.....	22
Discussion.....	24
References.....	29
Tables.....	36
<b>Anexos</b> .....	42

## Índice de tabelas

<b>Tabela A.</b> Classificação de neoplasias urotelias de bexiga ( <i>adaptado</i> WHO, 2004)	5
<b>Table 1.</b> Most frequent differential chromosomal gains and losses detected in urinary bladder carcinomas by HR-CGH.....	36
<b>Table 2.</b> Chromosomes abnormalities acquired by the recurrences of urinary bladder carcinomas.....	37
<b>Table 3.</b> Frequency of copy number alterations in the centromere 7 and 17 and in the 9p21 region by FISH in urinary bladder washes taken in the “free-of-neoplasia” periods of patients with history of urinary bladder carcinoma.....	38
<b>Table 4.</b> Frequency (%) of immunohistochemically p53-positive urothelial cells of patients with history of urinary bladder cancer.....	39
<b>Table 5.</b> Frequency (%) of immunohistochemically p53-positive urothelial cells of patients with history of urinary bladder cancer.....	41
<b>Tabela 6.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – paciente 1.....	46
<b>Tabela 7.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – paciente 2.....	47
<b>Tabela 8.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – paciente 3.....	48
<b>Tabela 9.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – pacientes 4, 5 e 6.....	49

<b>Tabela 10.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 7.....	50
<b>Tabela 11.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 8.....	51
<b>Tabela 12.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 9.....	52
<b>Tabela 13.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 10.....	53
<b>Tabela 14.</b> Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 11.....	54

## Índice de figuras

- Figura 1.** Padrão de marcação da HR-CGH para amostra de carcinoma urotelial marcada pela metodologia de SCOMP. A) Imagem capturada com filtro no espectro verde; B) Idem, no espectro vermelho; C) Idem, com filtro triplo e, D) padrão de banda GTG (DAPI-reverso), E) Perfil médio da HR-CGH. O desvio da linha azul para a esquerda indica perda (vermelho) e para a direita indica ganho (verde)..... 42
- Figura 2.** Ideograma demonstrando as regiões de perdas (vermelho) e ganhos (verde) genômicas nas amostras de carcinoma urotelial de baixo grau..... 43
- Figura 3.** Ideograma demonstrando as regiões de perdas (vermelho) e ganhos (verde) genômicas nas amostras de carcinoma urotelial de alto grau..... 44
- Figura 4.** Ideograma demonstrando as regiões de perdas (vermelho) e ganhos (verde) genômicas em todas as amostras de carcinoma urotelial utilizadas neste estudo.... 45

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **Tumores uroteliais da bexiga e alterações genéticas**

Os tumores uroteliais da bexiga (UBC) – que têm como uma de suas características mais marcantes taxas relativamente elevadas de recorrência, de progressão e invasividade dos tecidos vizinhos – constituem um modelo natural rico para o estudo da carcinogênese. Embora 70% dos carcinomas de células transicionais não sejam invasivos de início, tendem a progredir rapidamente quando não devidamente tratados; destes, aproximadamente 15% progridem para câncer invasivo (Lorenzo-Romero, 2003; WHO, 2004; Placer, 2005). Além disso, acima de 60% das denominadas neoplasias uroteliais superficiais recorrem após sua ressecção, e o comprometimento da parede muscular da bexiga implica em pior prognóstico, impondo intervenção cirúrgica agressiva como, por exemplo, a cistectomia radical (Koenig et al., 2000; Volanis et al., 2010). Nos últimos 20 anos, o aumento da expectativa de vida favoreceu o aumento da incidência do câncer de bexiga, totalizando 5% de todos os novos casos anuais. Com isso, o câncer de bexiga tornou-se o quinto mais frequente na sociedade ocidental. A sua ocorrência está fortemente relacionada com a exposição ocupacional, principalmente à aminas aromáticas, e ao hábito de fumar (Crawford et al., 2008; Volanis et al., 2010).

A cistoscopia e a citologia urinária, complementada ou não por biópsias, são consideradas procedimentos *padrão-ouro* para detectar o câncer de bexiga. No entanto, estas abordagens têm limitações operacionais, relacionadas à invasividade e morbidade das cistoscopias e biópsias, e à sensibilidade relativamente baixa da citologia urinária. Também, estes exames geralmente são negativos nos períodos “livres-de-neoplasia”, que são os intervalos entre a ressecção do tumor original e sua recorrência (Droller, 2002, Riesz et al. 2007, Ayati et al., 2008). No entanto, neste período “livre-de-neoplasia” o urotélio contém células

transformadas difusamente distribuídas na mucosa, que provavelmente são as responsáveis pela instabilidade urotelial e progressão da doença. Em estudo anterior em nosso laboratório registramos quebras cromossômicas importantes em células morfológicamente normais de pacientes neste período, obtidas por lavado vesical (Gontijo et al., 2002); observação semelhante foi feita por outros autores (Benhamou et al., 2003; Jones et al., 2005).

Há necessidade de marcadores sensíveis, específicos e de baixa morbidade, que permitam tanto a detecção precoce do câncer vesical como a estimativa de sua progressão (WHO, 2004; Diaz-Cano, 2008; Florl and Schulz, 2008). A identificação dos tumores que têm maior potencial para progressão pode sustentar decisões por tratamentos mais agressivos, que podem representar maior chance de cura da doença. Neste contexto, seria conveniente sua detecção precoce na urina miccional e ou no líquido do lavado das bexigas obtido nas cistoscopias de *follow-up* nos pacientes que tiveram neoplasia vesical ressecada.

O principal foco no estudo da carcinogênese vesical tem sido a detecção de alterações moleculares importantes nas fases iniciais e tardias da carcinogênese urotelial. As principais alterações iniciais estão relacionadas com a expansão clonal do tumor. Crawford (2008) descreve seis regiões cromossômicas críticas: 3q22-q24, 5q22-q31, 9q21-q22, 10q26, 13q14 e 17p13 que, por se encontrarem alteradas em carcinomas *in situ*, foram relacionadas com a expansão clonal da doença. Deleções no cromossomo 9, particularmente no braço longo (9p) também têm sido encontradas em tumores iniciais (pTa) (Cordon-Cardo, 2008; Florl and Schulz, 2008). As alterações consideradas tardias, ou seja, aquelas que estão presentes nos tumores de alto grau, contemplam os genes supressores tumorais TP53, PB e PTEN (Cordon-Cardo, 2008).



Além disso, alterações nos sistema reparo do DNA, que envolve genes *FANCC*, *FANCG* e *FANCF*, têm se mostrado relevantes no desenvolvimento da doença (Flori and Schulz 2008).

O desenvolvimento do câncer de bexiga segue o processo da carcinogênese química de múltiplas etapas, em que várias lesões no DNA são necessárias para que haja transformação maligna (Volanis et al., 2010). Dentre as alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento dos carcinomas uroteliais de bexiga estão as deleções no cromossomo 11, preferencialmente em 11p, fortemente associadas à progressão tumoral (Chan et al., 2009); perdas do cromossomo Y (Cheng et al., 2005), ampliações do gene *ERBB2* (17q11.2-q12) (Hansel et al., 2008); mutações nos genes *TP53* (17p13.1), *RB1* (13q14.2), *MYC* (8q24), *P14* (2pter-p25.1), *PTEN* (10q23) e *PTCH* (9q22.1-q31) (Malmstrom et al., 2002; Baffa et al., 2006; Kawamoto et al., 2006; Crawford, 2008), aumento da atividade da enzima telomerase (Sanchini et al., 2005; Koenig et al., 2000) e mutações do gene *FGFR3* (Kompier et al., 2010; Lindgren et al., 2010). Mutações em *TP53* (17p) ocorrem em 40-60% das neoplasias invasivas, com 90% delas nos éxons 3 e 9. Neste sentido, a mutação do *TP53*, ou sua expressão imunoistoquímica, tem sido usada como um marcador prognóstico em neoplasias pTa ( Lu et al., 2002; Eissa et al., 2009; Kompier et al., 2010). Aparentemente, mutações do oncogene H-RAS não estão relacionadas com o grau ou estadio dos tumores (Cattan et al., 2000).

Apesar de estas informações serem importantes para o tratamento e sobrevida do paciente, poucos estudos estão focados nos processos envolvidos na recorrência tumoral. Há estudos relacionados com a detecção precoce de alterações citogenéticas em lavado vesical e urina miccional, porém, eles só têm evidenciado alterações relevantes quando o tumor já está instalado (Placer et al., 2005; Riesz et al., 2007; Ayati et al., 2008). A detecção de marcadores

sensíveis capazes de prever precocemente alterações citogenéticas relacionadas com a recorrência tumoral pode minimizar o número de exames invasivos, como a cistoscopia e, melhorar a qualidade de vida do paciente.

Na última década, o aporte de grande volume de informações sobre os aspectos moleculares das neoplasias uroteliais levou a modificações de sua classificação que, agora, procura integrar seus aspectos morfológicos com o comportamento biológico e características moleculares (Placer et al., 2005; Diaz-Cano 2008; WHO, 2004a). Este acúmulo de conhecimento foi obtido pelo uso de técnicas variadas de exploração gênômica, como citogenética, hibridação fluorescente *in situ* (FISH), hibridação genômica comparativa (CGH), avaliação da perda de heterozigose (LOH) e análise da instabilidade de microssatélites.

Até há pouco tempo, as neoplasias uroteliais eram consideradas em dois grandes grupos, as “superficiais” (o carcinoma plano *in situ* – CIS -, e aquelas neoplasias papilíferas nos estadios pTa e pT1) e as “invasivas” (estadios pT2 ao pT4). Isto se baseava na crença de que neoplasias pT1 – que invadem somente até a lâmina própria da mucosa –, eram biologicamente mais próximas das superficiais (pTa e CIS), do que das neoplasias invasivas. Esta conceituação aparentemente não é mais válida, pois neoplasias tecidualmente próximas, como as em pTa e as em pT1, diferem quanto a presença de aneuploidias, que são mais frequentes nas últimas (Richter et al., 1997; Florl et al., 2008; Knowles 2001). Além disto, os tumores pT1 e os pT2-pT4 têm menos diferenças entre seus perfis de alterações moleculares do que entre os pTa e pT1 (Richter et al., 1997; Simon et al., 2001; Florl e Schulz, 2008).

Informações mais recentes permitiram o estabelecimento de dois grupos de neoplasias cujos aspectos moleculares têm correspondência com os padrões morfo-clínicos já conhecidos,

conforme classificados pela Organização Mundial da Saúde e pela Sociedade Internacional de Patologistas Urológicos (WHO/ISUP) em 1998 (Epstein et al., 1998; WHO, 2004): a) neoplasias papilíferas de baixo potencial maligno (LMPPN), que têm maior diferenciação e melhor prognóstico, b) carcinomas uroteliais papilíferos de baixo grau (LGPUC), com diferenciação e prognóstico intermediários, e c) carcinomas uroteliais papilíferos de alto grau (HGPUC), que têm chance maior de progressão e recorrência. Segundo proposta da WHO (2004), as LMPPN e os LGPUC não-invasivos (G1-G2, pTa) constituem o grupo de neoplasias “geneticamente estáveis”; as HGPUC não-invasivas (G3 e CIS, pTa) e os tumores invasivos em geral (pT1-pT4) constituem o grupo “geneticamente instável” (Tabela 1).

**Tabela A.** Classificação de neoplasias uroteliais de bexiga [*adaptado*, WHO, 2004].

Neoplasias não-invasivas	1. Neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial maligno	Neoplasias geneticamente estáveis
	2. Carcinoma papilífero não-invasivo de baixo grau 3. Carcinoma papilífero não-invasivo de alto grau	
Neoplasias invasivas	3. Carcinoma papilífero não-invasivo de alto grau 4. Carcinoma <i>in situ</i> / plano	Neoplasias geneticamente instáveis

pT1  
↓  
pT2-pT4

## Considerações Metodológicas

A **microdissecção a laser** (LCM) permite a coleta de estruturas histológicas ou de células individuais com diferentes finalidades, como obtenção de DNA ou de RNA. Neste caso, o procedimento de microdissecção fornece segurança para ensaios de biologia molecular, pois o material resultante da extração consiste apenas do *pool* do ácido nucléico de interesse (Hartmann et al., 2005). Esta técnica também se mostra eficiente e confiável na avaliação do processo da carcinogênese urinária de múltiplas etapas, permitindo correlacionar a presença de aberrações genéticas em tumores primários com a manifestação e progressão da doença para estágios mais avançados (Hartmann et al, 2005).

A **hibridação genômica comparativa de alta resolução (HR-CGH)** é uma metodologia de triagem genômica para identificação de alterações no número de cópias do DNA (perdas e ganhos). O método emprega DNA tumoral e normal marcados com agentes fluorescentes diferentes. A análise é feita em cromossomos metafásicos normais e é amplamente utilizada em tumores sólidos a fresco ou em amostras fixadas e incluídas em parafina (Kallioniemi et al., 1995; Simon et al., 2001; Chan et al., 2009). A abordagem pela CGH em carcinomas uroteliais revelou várias alterações, incluindo ganhos em 1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 7p, 8q, 10p, 17q, 20q e Xq e perdas em 2q, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 17p, 18q e Y. Regiões amplificadas também foram relatadas em 1q22-24, 3p24-25, 6p22, 8p12, 8q22, 10p12-14, 10q22-23, 11q13, 12q12-21, 17q21 e 20q13. Perdas em 2q, 3p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 17q, 18q foram confirmadas em estudos de perda de heterozigose (Billerey, 2001; Fadl-Elmula, 2005, Chan et

al., 2009). Estudos de validação dos resultados obtidos pela CGH revelaram ampliações ou expressão aumentada de oncogenes em neoplasias uroteliais invasivas, como o *HER2*, *EGFR* e o *CCND1* (Baffa et al., 2006).

A técnica de **hibridação fluorescente *in situ* (FISH)** é uma ferramenta valiosa para localização de seqüências de DNA de interesse, além da detecção e quantificação de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais; baseia-se no uso de sondas de DNA marcadas com fluoróforos ou com análogos de base nitrogenada que emitem fluorescência e que podem anelar-se a seqüências de DNA ou RNA complementares nos tecidos e células fixadas, sendo posteriormente visualizadas por microscopia de fluorescência. O processo de hibridação ocorre após a desnaturação de ambas as seqüências (sonda e DNA alvo). As sondas para cromossomos específicos permitem estudos de translocação e aneuploidia em células metafásicas ou em núcleos interfásicos, fornecendo forte sinal após hibridação (Hartmann et al., 2005; Ayati al., 2008).

A FISH tem sido utilizada para avaliação das alterações cromossômicas em células uroteliais neoplásicas e não-neoplásicas de pacientes com história de câncer de bexiga (Zellweger et al. 2006; Ayati et al., 2008). As alterações mais freqüentemente encontradas foram polissomias dos cromossomos 3, 7, 17 e monossomia do cromossomo 9 (Ayati et al., 2008). Esta última, e a alta freqüência de polissomia do cromossomo 17, foram relacionadas de maneira independente à recorrência do carcinoma urotelial. As perdas de 3p e 17p foram relacionadas com o maior grau do tumor e também ao desenvolvimento de tumores invasivos (Bollmann et al., 2005).

O kit comercial Urovision (Vysis, Downers Grove, USA) tem sido utilizado para a detecção de neoplasias não invasivas em material obtido por lavado vesical ou urina miccional. Este teste utiliza a multimarcação para a detecção de alterações numéricas nos cromossomo 3, 7, 17 e região 9p21, regiões críticas no desenvolvimento de neoplasia urotelial da bexiga (Zellweger et al. 2006).

### **Alterações genômicas no UBC**

Embora um número relevante de estudos tenha demonstrado o envolvimento de várias regiões genômicas alteradas em carcinomas uroteliais, ainda não foram claramente identificados os genes realmente decisivos para a progressão destas neoplasias (WHO, 2004). Em parte, isto é devido ao fato de os estudos terem focado tumores já bem desenvolvidos, clinicamente expressos, de modo que não se tem uma visão dinâmica do aparecimento, manifestação e destino das lesões precoces. Isto seria possível em um estudo com acompanhamento dos casos de neoplasias em que se pode analisar, em um mesmo paciente, a neoplasia inicial, a mucosa “normal” no período “livre-de-neoplasia” e quando possível, a recorrência tumoral.

Outra limitação das informações disponíveis é que elas têm sido geradas a partir das classificações já superadas de neoplasias uroteliais, e não atendem às concepções recentes que substanciam a nova classificação destes tumores. Por exemplo, existe a possibilidade de que alguns estudos não tenham levado em conta a importante diferença biológica – de reconhecimento recente – que existe entre as neoplasias papilíferas não-invasivas (pTa) e as

superficialmente invasivas (pT1) (Richter et al., 1998; WHO, 2004). Este cuidado poderia ser tomado, se no momento do estudo for realizada uma reclassificação dos tumores que atenda aos novos critérios de diagnóstico de neoplasias uroteliais (Epstein et al., 1998; WHO, 2004).

No estudo apresentado em anexo procuramos superar algumas dessas limitações. Para tanto, procurou-se detectar e caracterizar pela HR-CGH ganhos e perdas genômicas em neoplasias uroteliais classificadas conforme o sistema mais recente da OMS (WHO, 2004) e eventuais alterações numéricas de cromossomas nas fases “livre-de-neoplasia”, que precedem as recorrências neoplásicas. Finalmente, a expressão da proteína p53 foi avaliada tanto nos tumores quanto em biópsias de mucosa vesical negativas para neoplasia obtidas durante o follow-up dos pacientes com história de UBC. Nossos resultados fornecem um bom substrato para distinguir entre neoplasias uroteliais de baixo e alto grau. Além disso, indicam que alterações de ganhos e perdas cromossômicas apresentadas pelas recorrências devem ser consideradas no delineamento de estudos sobre a história natural dos UBCs. Finalmente, a avaliação quantitativa imunohistoquímica da proteína p53 pode ser um instrumento útil para prever recorrência em pacientes com história de UBC, mas no período em que estão livres desta neoplasia\*.

\* Os dados brutos deste estudo encontram-se no ítem Anexos

## **REFERÊNCIAS**



Ayati M, Tousi VN, Sabokba T, Vaziri-Nasab H, Mehrkhani F, Jamshidian H, Dastan J, Mosavi-Jarrahi AR, Ghaffari SR. Molecular cytogenetic analysis of urothelial carcinomas using urine samples. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2008 Oct-Dec; 9(4):687-90.

Baffa R, Letko J, McClung C, Lenoir J, Vecchione A, Gomella LG. Molecular genetics of bladder cancer: targets for diagnosis and therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006 Jun; 25(2):145-60.

Benhamou S, Laplanche A, Guillonneau B, Mejean A, Desgrandchamps F, Schrameck C, Degieux V, Perin F. DNA adducts in normal bladder tissue and bladder cancer risk. *Mutagenesis* 2003 Sep; 18(5):445-8.

Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez De Medina S, Van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, Van Der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F. Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors. *Am. J. Pathol.* 2001 Jun; 158(6):1955-59.

Bollmann M, Heller H, Bankfalvi A, Griefingholt H, Bollmann R. Quantitative molecular urinary cytology by fluorescence in situ hybridization: a tool for tailoring surveillance of patients with superficial bladder cancer? *BJU Int.* 2005 Jun, 95(9):1219-25.

Cattan N, Saison-Behmoaras T, Mari B, Mazeau C, Amiel JL, Rossi B, Gioanni J. Screening of human bladder carcinomas for the presence of Ha-ras codon 12 mutation. *Oncol. Rep.* May 2000; 7(3); 497-500.

Chan MW, Hui AB, Yip SK, Ng CF, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *Int J Oncol*. 2009 Apr; 34(4):963-70.

Cheng L, Jones TD, Mccarthy RP, Eble JN, Wang M, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Yang XJ, Koch MO, Zhang S, Pan CX, Baldrige LA. Molecular genetic evidence for a common clonal origin of urinary bladder small cell carcinoma and coexisting urothelial carcinoma. *Am J Pathol*. 2005 May; 166(5):1533-9.

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

Crawford JM. The origins of bladder cancer. *Lab Invest*. 2008 Jul; 88(7):686-93.

Diaz-Cano SJ. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology*. 2008 Jul; 53(1):1-19.

Droller, M.J. Current concepts of tumor markers in bladder cancer. *Urol. Clin. North Amer.*, v.29, p.229-234, 2002.

Eissa S, Zohny SF, Zekri AR, El-Zayat TM, Maher AM. Diagnostic value of fibronectin and mutant p53 in the urine of patients with bladder cancer: impact on clinicopathological features and

disease recurrence. *Med Oncol.* 2009, doi 10.1007/s12032-009-9375-9. PubMed PMID: 20012564.

Epstein, J.I., Amin, M.B., Reuter, V.R., Mostofi, F.K. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Amer. J. Surg. Pathol.* 1998 Dec; 22(12): 1435-48.

Fadl-Elmula I. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome* 2005 Aug; 4(1). doi: 10.1186/1475-9268-4-1. PubMed PMID: 16083510; PubMed Central PMCID: 1199610.

Flori AR, Schulz WA. Chromosomal instability in bladder cancer. *Arch Toxicol.* 2008 Mar; 82(3):173-82.

Gontijo, AM, Marcondes, J.P., Elias, FN, de Oliveira, ML, de Lima, RO, Salvadori, DM, de Camargo, JL. DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen.* 2002; 40(3):190-9.

Hansel DE, Swain E, Dreicer R, Tubbs RR. HER2 overexpression and amplification in urothelial carcinoma of the bladder is associated with MYC coamplification in a subset of cases. *Am J Clin Pathol.* 2008 Aug; 130(2):274-81.

Hartmann A., Stoehr R., Wild P.J., Dietmaier W., Knuechel R. Microdissection for detecting genetic aberrations in early and advanced human urinary bladder cancer. *Methods Mol Biol.* 2005, 293:79-92.

Jones TD, Wang M, Eble JN, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, Cocco A, Cheng L. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15; 11(18):6512-9.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll P, Waldman F. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995 Mar; 12(3):213-9.

Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M, Nakagawa M. p16<sup>INK4a</sup> and p14<sup>ARF</sup> methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jan; 339(3):790-6.

Knowles M.A. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. *J. Clin. Pathol: Mol. Pathol*. 2001 Aug; 54(4):215-21, 2001.

Koenig, F., Jung, K., Schnorr, D., Loening, S.A. Urinary markers of malignancy. *Clin. Chim. Acta* 2000 Jul; 297(1-2): 191-205.

Kompier LC, Van Tilborg AA, Zwarthoff EC. Bladder cancer: novel molecular characteristics, diagnostic, and therapeutic implications. *Urol Oncol*. 2010 Jan-Feb; 28(1):91-6.

Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, Sjö Dahl G, Hallden C, Chebil G, Veerla S, Ryden T, Månsson W, Liedberg F, Höglund M. Combined gene expression and genomic profiling define two

intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res.* 2010 May; 70(9):3463-72.

Lorenzo-Romero JG, Salinas-Sánchez AS, Gimenez-Bachs JM, Sanchez-Sanchez F, Escribano-Martinez J, Segura-Martin M et al. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. *The Journal of Urology* 2003 Feb; 169(2):492-9.

Lu ML, Wikman F, Orntoft TF, Charytonowicz E, Rabbani F, Zhang Z, Dalbagni G, Pohar KS, Yu G, Cordon-Cardo C. Impact of alterations affecting the p53 pathway in bladder cancer on clinical outcome, assessed by conventional and array-based methods. *Clin. Cancer Res.* 2002 Jan; 8(1): 171-79.

Malmstrom, P.U., Ren, Z.P., Sherif, A., De La Torre, M., Wester, K., Thorn, M. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. *J. Urol.* 2002 Nov; 168(5): 2240-44.

Placer J, Espinet B, Salido M, Solé F, Gelabert-Mas A. Correlation between histologic findings and cytogenetic abnormalities in bladder carcinoma: a FISH study. *Urology* 2005 May; 65(5):913-8.

Richter J, Jiang F, Görög JP, Sartorius G, Egenter C, Gasser TC, Moch H, Mihatsch MJ, Sauter G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1997 Jul; 57(14):2860-4.

Richter, J., Beffa, L., Wagner, U., Schrami, P., Gasser, T.C., Moch, H., Mihatsch, M.J., Sauter, G. Patterns of chromosomal imbalances in advanced urinary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. *Am J. Pathol.* 1998 Nov; 153(5):1615-21.

Riesz P, Lotz G, Páska C, Szendrői A, Majoros A, Németh Z, Törzsök P, Szarvas T, Kovalszky I, Schaff Z, Romics I, Kiss A. Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique. *Pathol Oncol Res.* 2007; 13(3):187-94.

Sanchini MA, Gunelli R, Nanni O, Bravaccini S, Fabbri C, Sermasi A, Bercovich E, Ravaioli A, Amadori D, Calistri D. Relevance of urine telomerase in the diagnosis of bladder cancer. *JAMA.* 2005 Oct; 294(16):2052-6.

Simon R, Eltze E, Schafer K, Burger H, Semjonow A, Hertle L. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Research* 2001 Jan; 61(1):355–362.

Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett.* 2010 Mar; 193(2):131-7.

WHO (2004). a) Infiltrating urothelial carcinoma (p.93-109). b) Non-invasive urothelial tumors (p.110-123). Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (p. 115-117). c) Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high grade (p. 117-118). d) Urothelial carcinoma in situ

(p. 119-120). e) Genetics and predictive factors of non-invasive urothelial neoplasms (p. 120-123). IN: Tumors of the urinary system and male genital organs. Edited by JN Eble, G Sauter, JI Epstein & IA Sesterhenn. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon.

Zellweger T, Benz G, Cathomas G, Mihatsch MJ, Sulser T, Gasser TC, Bubendorf L.

Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer*. 2006; 119(7):1660-5.

## **ARTIGO**



**Chromosomal imbalances in successive moments of human bladder urothelial carcinoma**

Merielen Garcia Nascimento<sup>1</sup>, Sara Martorelli da Silveira<sup>3</sup>, Bruno Fuin Castaldi<sup>1</sup>, José Carlos de Soza Trindade Filho<sup>3</sup>, Silvia Regina Rogatto<sup>2,3</sup>, João Lauro Viana de Camargo<sup>1</sup>

1 Center for Evaluation of Environmental Impact of Human Health (TOXICAM).

Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

2 Department of Urology, Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

3 AC Camargo Cancer Treatment and Research Center, São Paulo, Brazil

**Correspondence to:**

João Lauro Viana de Camargo

Distrito de Rubião Jr s/n

Faculdade de Medicina de Botucatu

Departamento de Patologia

Botucatu-SP, Brazil, 18618-970

+55 14 38116238

**Key words:** urinary bladder cancer, HR-CGH, FISH, p53

*To be submitted to:* Cancer Research

## **Abstract**

Urinary bladder carcinomas (UBC) frequently recur. During the intervals “free-of-neoplasia”, between the initially diagnosed tumor and its recurrences, there are not undisputable histological alterations in the mucosa, although some studies have reported DNA damage in urothelial cells. In order to understand developmental characteristics of UBC, primary tumors and their recurrences were cytogenetically evaluated for their genomic expression by High Resolution Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH). Tumors and their respective recurrences, six low-grade (LG) and five high-grade (HG) cases, provided 20 tissue samples that were submitted to laser microdissection capture followed by HR-CGH. HR-CGH profiles had two different analyses – all tumors altogether or classified according to their respective histological grades. Both comparisons showed high frequency (80%) of gains in 11p12 and losses in 16p12, in agreement with the literature that indicate alterations of 11p and 16p in UBC recurrences. These findings suggest that those chromosome regions contain putative oncogenes and tumor suppressor genes critical for urinary bladder carcinogenesis. Within a same patient genomic profile showed high agreement between tumors and their respective recurrences, i.e., tumors from the same patient showed a large number of common losses and gains. The high similarities of genomic alterations in successive tumors from the same patient suggest that a stable genomic profile was established in UBCs and their recurrences. Besides, during the “free-of-neoplasia” intervals, negative urinary bladder washes were submitted to Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) to detect quantitative alterations in centromeres 7 (n=21 samples), 17 (n= 21) and 9p21 (n=36). No numerical alterations were found in these regions. Therefore, FISH did not contribute to find numerical changes in these chromosomes during the “free-of-neoplasia” periods. In a supplementary analysis, 30 UBC patients provided 85 samples for immunohistochemical analyses of the p53 protein. Tumor samples from a same patient did not show a common quantitative pattern of protein p53 expression.

However, when the samples were analyzed altogether, p53 expression was directly proportional to the tumor grades. Urothelial biopsies taken during the “free-of-neoplasia” period revealed that one third of patients with no histological alterations had more than 25% of urothelial cells labeled for the p53 protein. The meaning of p53 expression in apparently normal mucosa of patients with history of previous UBC should be explored regarding its potential as a marker for recurrences.

### **Introduction**

The increased life expectancy during the last 20 years has led to a concomitant rise in the incidence of urinary bladder cancer (UBC), which currently accounts for up to 5% of all new human neoplasia. Accordingly, UBC is the fifth most common cancer in the Western world. More than 60% of these tumors recur at least once and may progress to less differentiated and or invasive neoplasm in 10-15% of all cases (Volanis et al., 2010).

UBCs are characterized by a number of chromosomal and genetic alterations but during the intervals “free-of-neoplasia” – periods between the resection of the initially diagnosed tumor and its late recurrences - there are not undisputable histological alterations in the mucosa (Lindgren et al., 2008). However, in these periods the urothelium contains transformed cells distributed throughout the mucosa, which probably are responsible for urothelial instability and disease progression (Benhamou et al., 2003; Jones et al., 2005). A previous study from this laboratory recorded a number significantly increased of chromosomal breaks in morphologically normal urothelial cells obtained by bladder washing in the “free-of-neoplasia” period of UBC patients (Gontijo et al., 2002).

Many tumor characteristics have been studied in an attempt to predict the variable UBC behavior. These include histopathologic and cytologic features, and also some putative molecular markers. The hitherto best known molecular event predictive of advanced malignant progression is the loss of the p53 protein function, which is found in the majority advanced urinary bladder cancers (Zieger et al., 2009). The current WHO classification (2004) tries to integrate tumor morphology with its biological behavior and molecular characteristics and considers a “genetically unstable” tumor those that show high p53 protein immunoeexpression.

In order to document developmental characteristics of these urinary bladder tumors, primary UBC and their recurrences were cytogenetically evaluated for their genomic expression by High Resolution Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH). Besides, during the “free-of neoplasia” periods, negative urinary bladder washes were submitted to Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) using probes for three different regions frequently altered in the urothelial tumor cells. Finally, the expression of the p53 protein was immunohistochemically evaluated in initial tumors and their recurrences in 30 UBC patients.

## **Materials and methods**

### Patients and tumor specimens

This study was approved by the Committee for Ethics in Research of the Botucatu Medical School (FMBo), UNESP, SP, Brazil (Protocolo n° 399/2005). UBCs patients were diagnosed, treated and followed up at the Urology Service of the FMBo/UNESP General Hospital; tissue samples from the initial tumors and from their recurrences were paraffin blocked and filled at the Department of Pathology, FMBo, UNESP.

#### High Resolution - Comparative Genomic Hybridization (HR-CGH)

Primary tumor and their recurrences, six patients with low-grade and five high-grade papillary carcinomas were selected for HR-CGH analyses, resulting in 20 samples studied. Tumor cells were obtained by laser capture microdissection (LCM) (Pix Cell II Laser Capture Microdissection, Arcturus Inc., EUA). The DNA was extracted by Nucleon for Hard Tissue kit (Amershan Bioscience) and stored at -80°C. DNA tumor tests and references were amplified and labeled by PCR-based protocols (SCOMP, Single Cell Comparative Genomic Hybridization) as described by Stoecklein et al. (2002), with modifications. Phytohemagglutinin-stimulated normal lymphocytes were prepared as targets for HR-CGH experiments using a standard protocol (Albertini et al. 2000). The hybridization and washes were performed as described by Kallioniemi et al. (1992). Briefly, target DNA and normal reference DNA were labeled with biotin-14-dATP (Invitrogen, USA) and digoxigenin-11-dUTP (Roche,USA), respectively. Tumor and Cot1 DNA, both labeled, were co-hybridized to normal chromosomes metaphases of

lymphocytes from healthy donors. Slides were hybridized for 72h, washed and counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. HR-CGH images were captured using an Olympus AX61 fluorescence microscope (Olympus Optical, Hamburg, Germany) equipped with a CCD camera (Photometrics CH 250, Huntington Beach, CA). The software Applied Spectral Imaging CGH View 3.0 was used for image analysis. In each case, 15-30 metaphases were analyzed. Chromosomal imbalances were detected by standard reference intervals, as described in Kirchhoff et al. (1998). Superposed chromosomes and heterogeneous hybridization patterns were excluded from the analyses. A library with differentially labeled normal samples was constructed to select the upper and lower limits for chromosomal gains and losses (standard reference intervals). The 99.5% confidence interval of each mean ratio profile value was compared to a corresponding 99.5% standard reference interval based on an average of 15 normal DNA samples obtained from volunteers without cancer (140 lymphocyte cells). The standard reference interval was scaled automatically to fit the individual test case.

#### Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH)

During the follow-up of patients with history of surgically-removed UBC, 36 urinary bladder washes cytologically negative for neoplastic cells were submitted to FISH. Probes to centromeres 7, 17 and 9p21 region (Poseidon, Kreatch Diagnostics) were applied in 21, 21 and 36 urinary bladder washes respectively according to the manufacturer's recommendations. The software Applied Spectral Imaging FISH View 5.5 was used for image analysis. Every viable cell in the slide was analyzed and variations of

the number of labeled regions were quantified. A positive FISH result was assumed when five or more urinary cells presented gains or losses in the regions explored (Ayati et al., 2005)

#### Immunohistochemical evaluation of the p53 protein

Thirty patients with history of surgically-removed UBC had the initially-diagnosed tumors, their recurrences, and the “normal” urothelial mucosa samples taken during the period “free-of-neoplasia”, analyzed for the quantitative expression of the protein p53, totalizing 85 samples. Another 42 samples of patients with history of UBC but with only one biopsy available in our service – either from the primary tumor or the recurrence -, were added in order to increase our sampling to help to evaluate the relationship between p53 expression and UBCs grade. All tumors were reviewed and classified according to Epstein et al. (1998). Three flat carcinomas were grouped in the invasive HG papillary carcinoma group since they are also considered “genetically unstable” lesions (WHO, 2004). The expression of p53 was detected in a total of 127 tissue samples using the monoclonal primary antibody anti-p53, clone DO-7 (DakoCytomation), in a 1:50 concentration followed by the LSAB+System-HRP (DakoCytomation) procedure (Warnke and Levy, 1980). Histological sections of larynx carcinomas were used as positive control (Peschos et al., 2005). p53-positive nuclei were counted using a conventional optical microscope (Olympus BX 40), the quantification based on the criteria of Hsu et al. (2008) that categorize p53 positive cells in quartiles as follows: negative, <25%, <50%, <75% and >75% positively stained cells.

## Results

Some HR-CGH-detected chromosomal imbalances appeared in high frequencies in the tumors (Table 1). Eighty percent of all tumors showed 7 losses and 7 gains; when histological grades were considered, LG tumors showed 11 common losses and 3 gains (80% of cases) and HG tumors showed 9 common losses and 14 gains (77% of cases). Gains in 1q22-1q23 and 11q12 and losses in 16p12 were altered concomitantly in LG and in HG tumors. Loss in 1q41 occurred in every LG tumor and gains in 2p11.2, 2q11.2-q12, 7q21 and 11q12 occurred in every HG tumor (Table 1).

Within the same patient, genomic profile showed high agreement among initial tumors and their recurrences. All tumors from the same patient shared a set of 26-60 identical alterations (losses and gains) in LG and 30-40 (losses and gains) in HG cases, with prevalence of losses in both types of tumors (*data not shown*). However, the imbalances acquired during the recurrences were different when low and high-grade tumors were compared; the most frequently acquired imbalances are listed in the Table 2. . A set of 21-60 imbalances were acquired in LG tumors, with predominance of gains; HG tumors showed a set of 18-34 new imbalances, with predominance of losses.

Although rare numerical alterations were found in the centromeres of chromosomes 7, 17 and 9p21 region by FISH in urothelial cells obtained by urinary



bladder washes during the “free-of-neoplasia” periods in patients with history of UBC, they were not considered biologically relevant (Table 3).

Among the 30 patients submitted to the immunohistochemical evaluation of the protein p53, 19 had at least two successive recurrences with the same tumor grade; most of them (12 cases) showed the same quantitative level of p53 expression. In those same cases, when the next recurrences occurred, it was not possible to identify a p53 standard expression (Table 4). The incidences of LG, non-invasive HG and invasive HG papillary carcinomas with  $\geq 75\%$  p53-positive cells were 2%, 14% and 25% respectively (Table 5), a clear relationship between p53 expression and tumor aggressiveness. Most of the urinary bladders without neoplasia showed rare (<25%; 33% of samples) or no (33% of samples) p53-positive cells. However, five (33%) of the 15 cases showed a relatively high incidence of p53 positive cells (>25%), similar to the levels registered in some tumors. Among these five patients, 4 patients had UBC recurrence (cases 1, 10, 11 and 22; Table 4).

## **Discussion**

Herein, HR-GGH analyses indicated that in low grade urinary bladder tumors genomic losses are more frequent than gains, and high grade tumors show more gains than losses. Genomic losses have been associated to tumor suppressor genes in the pathogenesis of urinary bladder cancers; otherwise, genomic gains may indicate that oncogenes are associated to increased tumor aggressiveness (Fadl-Elmula et al. 2000; Fadl-Elmula 2005). Since LG tumors may progress to HG ones, our data suggest that in

some circumstances loss of tumor suppressor genes is followed by activation of protooncogenes during the urinary bladder urothelial carcinogenesis process.

UBC karyotyping is characterized by high heterogeneity of chromosomal alterations (Fadl-Elmula, 2005). However, the group of tumors herein studied showed very high frequency of some common chromosomal imbalances, when they were considered altogether. These altered common regions, listed in Table 1, are probably prone to be involved in the process of carcinogenesis in general, i.e., most of these regions have been reported to be altered in different type of tumors. For example, loss in 1q41 and gain in 2p11.2 were found in breast cancers (Corson et al., 2005; Mastracci et al., 2006), gain in 11q12 is involved in prostate and kidney tumors (Best et al., 2005; Johanneson et al., 2007) and losses in 18p11.2 and in 20p12 occur in esophageal tumors (Nakakuki et al., 2002; Qin et al., 2008). On the contrary, some imbalances found in LG tumors revealed to be more specific to UBC development. Gains in 1q22-q24 and loss in 1p22-p23 and in 6q are related to urothelial tumor progression (Kallioniemi et al., 1995; Richter et al., 1999). Another relevant imbalance found in LG tumor is the loss in 9p21, which appear to be an early event, related to tumor initiation. At this region there is the CDKN2A gene, which encodes p16<sup>INK4A</sup> and p14<sup>ARF1</sup> that are negative cell cycle regulators proteins and are, therefore, considered potential tumor suppressor genes (Placer et al., 2005; Ayati et al., 2008; Florl and Schulz, 2008). Exclusive alterations in HG tumors included imbalances in chromosome 8 and 11. These alterations have been already related to progression and invasion of HG urothelial tumors (Fadl-Elmula et al., 2000; Simon et al., 2001; Eguchi et al., 2010). High-grade tumors also present imbalances in

chromosome 5, but the role of this alteration remains unclear. Simon et al. (2001) denominate this alteration a late event in UBC carcinogenesis, and Zieger et al. (2009a) detected this alteration in carcinoma *in situ*, i.e., in an early HG tumor. In this context, our results are in line with this late involvement of chromosome 5 imbalances during urothelial carcinogenesis. The imbalances found were present in at least 77% of the cases studied, a level much higher than the one usually considered (28%) as indicating genes putatively critical for urinary bladder carcinogenesis under HR-CGH approach (Simon et al., 2001).

Urinary bladder carcinomas from a same patient showed a large number of losses and gains in common, revealing a similar genomic profile and supporting a clonal expansion of neoplastic cells. In the most general sense, conventional models of carcinogenesis suppose the existence of successive mutation events within a specific cell clone, enabling its eventual escape from regulatory mechanisms for cell division and maintenance of genome integrity (Crawford, 2008). Herein, the number of imbalances acquired by the tumor recurrences was high. These acquired alterations can be related to tumor progression in many different ways. The key issue is that mutations that provide a selective advantage are essential for tumorigenesis (Bodmer, 2008). Biologically, neoplasm develop through acquisition of capabilities that involve tumor cell aspects and modified microenvironment interactions, resulting in unrestricted growth due to a stepwise accumulation of cooperative genetic alterations that affect key molecular pathways (Diaz-Cano, 2008) . Over the last years, checkpoint dysfunction has emerged as a common factor contributing to different mechanism of chromosome

imbalance in bladder cancer (Flori and Schulz, 2008). Our findings may provide valuable information about genes critical for urinary bladder carcinomas.

Early detection of bladder cancer recurrence is critical to improve patient prognosis and decrease the need of cystectomy, by identifying tumor recurrence before they become muscle invasive (Crawford, 2008). No numerical alterations of the centromeres of chromosomes 7 and 17 and 9p21 region were found by FISH during the “free-of-neoplasia” periods. However, early and LG tumors are more difficult to diagnose than HG ones (Ayati et al., 2008). However, DNA damage has been reported in urinary bladder “free-of-neoplasia” (Gontijo et al., 2002; Benhamou et al., 2003; Jones et al., 2005). Conjugated with our findings, this information suggests that the FISH parameters adopted in this study or the procedure sensitivity were not capable of detecting early alterations in a “normal” mucosa prone to UBC development. Efforts should be done to find more sensible biomarkers.

Protein p53 quantitative expression did not show a stable quantitative pattern within tumor samples from the same patient. However, when the samples were analyzed altogether, quantitative p53 expression was directly proportional to tumor grades. Therefore, although not a consistent marker for individual tumor, our data confirms that immunohistochemically detected p53 is a general marker of UBC aggressiveness (Lorenzo-Romero et al., 2003; Salinas-Sánchez et al., 2007). The relatively increased amount of p53-positive cells in “normal” mucosa of patients with history of UBC suggests that they can be more susceptible to recurrence than those

which lower number of marked cells. The meaning of p53 expression in apparently normal mucosa of patients with history of previous UBC should be explored regarding its potential as a marker for recurrences.

During the “free-of-neoplasia” periods, cells obtained by urinary bladder washes did not show any numerical alterations of the chromosome 17, where the p53 protein is encoded. Moreover, HR-CGH also did not revealed imbalances of that chromosome in tumor samples. Considering that some morphologically normal mucosa taken during the “free-of-neoplasia” periods had increased number of p53-positive cells, the question remains on how to explain this increased expression of that protein. Several mechanisms can lead to loss of p53 function, e.g. gene mutation or loss, transcriptional downregulation and enhanced degradation (Zieger et al., 2009). Our data suggest that loss in chromosome 17 should not be the main molecular event related to alterations of p53 protein expression.

In conclusion, our data provide good substrate to distinguish early from late events in UBCs. The chromosomal imbalances acquired by tumor recurrences should be considered in order to point out further experiments on the biological nature of UBCs recurrences. Immunohistochemical detection of the p53 protein could be a helpful tool to predict recurrences of patients with history of previous UBC.

## **Funding**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (05/58917-0, 06/55634-0); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (304690/2006-6) and Center for Evaluation of Environmental Impact of Human Health (TOXICAM). Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

## **Acknowledgements**

We are very thankful to Dr. Rodrigo Mattos dos Santos, Ph.D. and Luciana Scudeletti, biologist, who provided helpful technical assistance. Dr. Lician Vaz de Arruda Silveira, Ph.D., provided assistance with the statistical analyzes.

## **References**

Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar I, Hemmink K, Merlo F et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 2000 Aug; 463:111-72.

Ayati M, Tousi VN, Sabokba T, Vaziri-Nasab H, Mehrkhani F, Jamshidian H, Dastan J, Mosavi-Jarrahi AR, Ghaffari SR. Molecular cytogenetic analysis of urothelial carcinomas using urine samples. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2008 Oct-Dec; 9(4):687-90.

Benhamou S, Laplanche A, Guillonneau B, Mejean A, Desgrandchamps F, Schrameck C, Degieux V, Perin F. DNA adducts in normal bladder tissue and bladder cancer risk. *Mutagenesis* 2003 Sep; 18(5):445-8.

Best CJ, Gillespie JW, Yi Y, Chandramouli GV, Perlmutter MA, Gathright Y, Erickson HS, Georgevich L, Tangrea MA, Duray PH, González S, Velasco A, Linehan WM, Matusik RJ, Price DK, Figg WD, Emmert-Buck MR, Chuaqui RF. Molecular alterations in primary prostate cancer after androgen ablation therapy. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct; 11(19):6823-34.

Bodmer W. Tumor instability is not a requirement for tumor development. *Cancer Res* 2008 May; 68(10):3558-61.

Corson TW, Huang A, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. *Oncogene*. 2005 Jul 14; 24(30):4741-53.

Crawford JM. The origins of bladder cancer. *Lab Invest*. 2008 Jul; 88(7):686-93.

Diaz-Cano SJ. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology* 2008 Jul; 53(1):1-19.

Eguchi S, Yamamoto Y, Sakano S, Chochi Y, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Oga A, Matsuyama H, Sasaki K. The loss of 8p23.3 is a novel marker for predicting progression and recurrence of bladder tumors without muscle invasion. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Jul; 200(1):16-22.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Amer. J. Surg. Pathol.* 1998 Dec; 22(12):1435-48.

Fadl-Elmula I, Gorunova L, Mandahl N, Elfving P, Lundgren R, Mitelman F, Heim S. Karyotypic characterization of urinary bladder transitional cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Nov; 29(3):256-65.

Fadl-Elmula I. Chromosomal changes in uroepithelial carcinomas. *Cell Chromosome* 2005 Aug; 4(1). doi: 10.1186/1475-9268-4-1. PubMed PMID: 16083510; PubMed Central PMCID: 1199610.

Florl AR, Schulz WA. Chromosomal instability in bladder cancer. *Arch Toxicol.* 2008 Mar; 82(3):173-82.

Gontijo, AM, Marcondes, J.P., Elias, FN, de Oliveira, ML, de Lima, RO, Salvadori, DM, de Camargo, JL. DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. *Environ. Mol. Mutagen.* 2002; 40(3):190-9.

Hsu L-I, Chiu AW, Pu Y-S, Wang Y-H, Huan SK, Hsiao C-H, Hsieh F-I, Chen C-J. Comparative genomic hybridization study of arsenic-exposed and non-arsenic-exposed urinary transitional cell carcinoma. *Toxicol and Applied Pharmacol.* 2008 Mar; 227(2):229–38.



Johanneson B, Deutsch K, McIntosh L, Friedrichsen-Karyadi DM, Janer M, Kwon EM, Iwasaki L, Hood L, Ostrander EA, Stanford JL. Suggestive genetic linkage to chromosome 11p11.2-q12.2 in hereditary prostate cancer families with primary kidney cancer. *Prostate* 2007 May; 67(7):732-42.

Jones TD, Wang M, Eble JN, MacLennan GT, Lopez-Beltran A, Zhang S, Cocco A, Cheng L. Molecular evidence supporting field effect in urothelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep; 11(18):6512-9.

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Citro G, Sauter G, DeVries S, Kerschmann R, Carroll P, Waldman F. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995 Mar; 12(3):213-9.

Kirchhoff M., Gerdes T., Rose H., Maahr J., Ottesen A.M., Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry.* 1998 Mar; 31(3):163-173.

Lindgren D, Frigyesi A, Gudjonsson S, Sjö Dahl G, Hallden C, Chebil G, Veerla S, Ryden T, Månsson W, Liedberg F, Höglund M. Combined gene expression and genomic profiling define two intrinsic molecular subtypes of urothelial carcinoma and gene signatures for molecular grading and outcome. *Cancer Res.* 2010 May; 70(9):3463-72.

Lorenzo-Romero JG, Salinas-Sánchez AS, Gimenez-Bachs JM, Sanchez-Sanchez F, Escribano-Martinez J, Segura-Martin M et al. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. *The Journal of Urology* 2003 Feb; 169(2):492-9.

Mastracci TL, Shadeo A, Colby SM, Tuck AB, O'Malley FP, Bull SB, Lam WL, Andrulis IL. Genomic alterations in lobular neoplasia: a microarray comparative genomic hybridization signature for early neoplastic proliferation in the breast. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Nov; 45(11):1007-17.

Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2002 Jan; 23(1):19-24.

Peschos D, Stefanou D, Vougiouklakis T, Assimakopoulos DA, Agnantis NJ. Cell cycle proteins in laryngeal cancer: role in proliferation and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2005 Sep; 24(3):431-7.

Placer J, Espinet B, Salido M, Solé F, Gelabert-Mas A. Correlation between histologic findings and cytogenetic abnormalities in bladder carcinoma: a FISH study. *Urology* 2005 May; 65(5):913-8.

Qin YR, Wang LD, Fan ZM, Kwong D, Guan XY. Comparative genomic hybridization analysis of genetic aberrations associated with development of esophageal squamous cell carcinoma in Henan, China. *World J Gastroenterol*. 2008 Mar; 14(12):1828-35.

Richter J, Wagner U, Schraml P, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser TC, Sauter G. Chromosomal imbalances are associated with a high risk of progression in early invasive (pT1) urinary bladder cancer. *Cancer Res.* 1999 Nov; 59(22):5687-91.

Salinas-Sánchez AS, Atienzar-Tobarra M, Lorenzo-Romero JG, Sánchez-Sánchez F, Giménez-Bachs JM, Donate-Moreno MJ et al. Sensitivity and specificity of p53 protein detection by immunohistochemistry in patients with urothelial bladder carcinoma. *Urol Int.* 2007; 79(4):321–7.

Simon R, Eltze E, Schafer K, Burger H, Semjonow A, Hertle L. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Research* 2001 Jan; 61(1):355–362.

Stoecklein NH, Erbersdobler A, Schmidt-Kittler O, Diebold J, Schardt JA, Izbicki JR et al. SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue sample. *American Journal of Pathol.* 2002 Jul; 161(1):43-51.

Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett.* 2010 Mar; 193(2):131-7.

Warnke R and Levy R. Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseadish peroxidase method. *J. Histochem Cytochem* 1980 Aug; 28(8):771-76.

WHO (2004). **a)** Infiltrating urothelial carcinoma (p.93-109). **b)** Non-invasive urothelial tumors (p.110-123). Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential (p. 115-117). **c)** Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high grade (p. 117-118). **d)** Urothelial carcinoma in situ (p. 119-120). **e)** Genetics and predictive factors of non-invasive urothelial neoplasms (p. 120-123). IN: Pathology and Genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. Edited by JN Eble, G Sauter, JI Epstein & IA Sesterhenn. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon.

Zieger K, Marcussen N, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjøt L. Consistent genomic alterations in carcinoma in situ of the urinary bladder confirms the presence of two major pathways in bladder cancer development. *Int J Cancer*. 2009(a) Nov; 125(9):2095-103.

Zieger K, Wiuf C, Jensen KM, Orntoft TF, Dyrskjøt L. Chromosomal imbalance in the progression of high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *BMC Cancer*. 2009 May; 9:149. doi:10.1186/1471-2407-9-149. PubMed PMID: 19445696, PubMed Central PMCID: PMC2696467.

**Table 1.** Most frequent differential chromosomal gains and losses detected in urinary bladder carcinomas by HR-CGH.

Chromosome	Tumors samples (n=19) *		Low grade (n=10) *		High grade (n=9) *	
	Losses	Gains	Losses	Gains	Losses	Gains
1	q41	q23-32	p36.1, <b>q41</b>	q22-q24	-	p12-p13, q22-q23
2	-	p11.2, q11.2, q12	p22-p23	q22	p24, q35-q36	<b>p11.2</b> , p12, <b>q11.2</b> - <b>q12</b>
3	-	-	-	-	-	q13.1, q13.3
4	-	-	-	-	-	q12-q13, q24
5	q34	-	-	-	-	q14
6	-	q12-q13	q12-q13, q14	-	-	-
7	-	q11.2	-	-	-	q11.2, <b>q21</b>
8	-	-	-	-	q24.1	q12
9	q32-q33	-	p21	-	q31-q34	-
10	-	-	p13	-	-	-
11	-	q12	-	11q12	-	<b>q12</b>
12	-	-	-	-	q23-q24.1	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	p12-p13.1, q22	-	p12, p13.1, q22	-	p12-p13.1, p13.2-p13.3	-
17	-	-	-	-	-	-
18	p11.2	-	p11.2-p11.3	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	p12	-	-	-	p11.2, p12, q12	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
X	-	-	-	-	-	-
Y	-	-	-	-	-	-

\* Imbalances present in 80, 80 and 77% of all tumors, low-grade and high-grade tumors, respectively. In bold are the alterations present in 100% of the cases

**Table 2.** Chromosomes abnormalities acquired by the recurrences of urinary bladder carcinomas.

Chromossome	Low grade		High grade	
	Losses	Gains	Losses	Gains
1	p32, q43-q44	p13-p22, p31,	p22(2), p32, q31(2), q32, ,p36.1-p36.2	q21
2	p22-p25	p15, p16 (2), q24, q31-q32 (2), q37	p16, q35-q37	q11.2, q21-q23, q24 (2), q31, q37
3	q28-q29	p12-p14, p21, q13.1-q13.3, q23, q24 (2), q25 q26.1-q28	p14, p21, p24, q25	p21, q12, q13.1-q13.3, q26.3-q29,
4	q34	p12-p14 (2), p15.2, q12, q24-q31.1	q32-q35 (2), p15.3	p11, p12(2), p13-p15.1, q12-q28 (2)
5	p14-p15.3	p12-p13	p15.3, q31-q35	q11.2
6	p23	p12 (3), p21.1-p21.3 (2), p24-p25,	q25	p21.1(2), p22, p23-p25, q14
7	p22, q31, q34-q36	p12, p15, p21, q11.2, q31(2)	p21, q31	q11.2, q21, q32-q33
8	q24.2-q24.3	p11.2-p12 (2), q12, q21.1, q22 (2)	p11.2-p23, q21.1, q21.3,	p12
9	p23	p12 (3), p13, q12, q13-q21, q21 (2), q22	p21 (2), p23, q31, q34	-
10	p11.2, p13,	q11.2 (2), q21, q23 (2)	p12(2), q24	p11.2-p15, q11.2, q21-q22
11	p15, q14, q25	p11.2 (2), p14, q13-q14, q22 (2)	p13, p14-p15, q23-q25,	p11.2-p12,
12	q21	p11.2 (3), p12 (2), q12, q13(2), q14, q23, q24.1, q24.3	p12-p13 (2), q21-q24.3	p11.2
13	q31-q32(2)	q12, q13 (2), q21 (2), q24, q32-q34	-	q12, q33-q34, q34
14	q12-q14, q15, q23-q24	-	q23-q24 (2), q25-q32, q13-q32,	q12, q13, q26
15	p12-p13.3, q15, q21 (3), q26, q22-q25,	-	q26	
16	q25	p11.2, q11.2, q13, q21(2), q24	p12-p13.3	p11.2
17	p11.2, q11.2	q21	p12-p13(2), q11.2-q12(2), q13-q21,	-
18	p13.3, q11.2	q11.2-q21, q23	q22, q24-q25(2)	p11.3, p11.2
19	-	q13.1	p11.2, p11.3, q21-q23	-
20	q21-q22	q13.2	p11.2-p13	-
21	q11.2-q22	q22	-	q22
22	p21, p22.3	q11.2-q13	q12, q13(2)	q11.2
X	p21-p22.1 (2), p22.3, q26-q27	p11.2 (2), p11.3-p21, q12, q13 (2), q21 (2), q22, q28	p21-p22.2	p11.2-p11.4, p22.1-p22.3, q13, q2:
Y	-	q11.2 (2)	-	p11.1-p11.2

(n) number of times that the imbalance occurred

**Table 3.** Frequency of copy number alterations in the centromere 7 and 17 and in the 9p21 region by FISH in urinary bladder washes taken in the “free-of-neoplasia” periods of patients with history of urinary bladder carcinoma.

	9p21 region <sup>a</sup>	Centromere 7 <sup>a</sup>	Centromere 17 <sup>a</sup>
Number of cases	36	21	21
Mean number of cells analyzed per case	87.1 ± 41.4	109.90 ± 40.76	112.95 ± 40.3
Mean number of cells with copy number alteration	0.2 ± 0.4*	0.19 ± 0.51*	0.67 ± 1.01*

FISH: fluorescent *in situ* hybridization; <sup>a</sup> Values are expressed as mean ± S.D, \*Significantly different from number of cell analyzed per case (p<0.0001, Binomial test).

**Table 4.** Frequency (%) of immunohistochemically p53-positive urothelial cells of patients with history of urinary bladder cancer.

Patient	Successive Biopsies	Time of recurrence (month)	Tumor Grades*	p53-positive cells
1	A	-	LG	< 75%
	B	2,40	LG	< 50%
	C	2,70	NN	< 75%
	D	17,10	LG	< 25%
	E	3,80	NN	Negative
	F	2,53	HG	< 25%
2	A	-	LG	< 50%
	B	0,53	LG	< 25%
	C	7,10	HG	< 75%
	D	1,27	LG	< 50%
	E	9,57	HG	< 25%
	F	2,93	HG	< 25%
3	A	-	LG	< 50%
	B	3,97	HG inv	< 75%
	C	3,00	HG	< 50%
	D	4,53	LG	< 50%
	E	6,70	HG	< 25%
4	A	-	LG	> 75%
	B	9,53	LG	< 50%
	C	3,03	LG	< 50%
	D	8,00	HG	< 25%
	E	9,83	HG	< 25%
5	A	-	LG	< 75%
	B	0,50	NN	< 50%
	C	12,33	NN	Negative
	D	27,00	NN	Negative
6	A	-	LG	< 75%
	B	0,70	LG	< 25%
	C	7,23	LG	< 25%
	D	5,27	LG	< 25%
7	A	-	HG	Negative
	B	69,80	HG	< 50%
	C	12,80	HG	< 25%
8	A	-	LG	< 25%
	B	5,37	LG	< 25%
	C	10,57	LG	< 50%
9	A	-	LG	< 50%
	B	12,93	LG	< 50%
	C	8,67	LG	< 50%
10	A	-	NN	< 25%
	B	31,27	LG	< 75%
	C	1,80	LG	< 75%



11	A	-	NN	< 50%
	B	1,13	Ca in situ	> 75%
	C	0,63	HG inv	> 75%
12	A	-	LG	< 25%
	B	12,57	HG	< 25%
	C	1,87	NN	< 25%
13	A	-	HG	< 25%
	B	1,33	HG	Negative
	C	3,77	NN	< 50%
14	A	-	HG inv	< 25%
	B	5,93	HG inv	< 25%
15	A	-	HG	> 75%
	B	5,00	HG	< 75%
16	A	-	HG inv	> 75%
	B	7,60	HG inv	< 50%
17	A	-	LG	< 50%
	B	4,07	LG	< 25%
18	A	-	LG inv	< 25%
	B	37,53	HG	< 25%
19	A	-	HG	< 25%
	B	0,67	HG inv	< 25%
20	A	-	HG inv	Negative
	B	53,13	HG	< 25%
21	A	-	HG	< 50%
	B	28,10	HG	< 25%
22	A	-	NN	< 25%
	B	12,43	HG	Negative
23	A	-	HG	> 75%
	B	24,10	HG	> 75%
24	A	-	HG inv	< 25%
	B	0,37	HG inv	< 25%
25	A	-	HG	< 50%
	B	5,87	HG inv	< 50%
26	A	-	HG inv	< 25%
	B	3,27	HG	< 50%
27	A	-	LG	< 25%
	B	67,63	N	Negative
28	A	-	LG	< 25%
	B	8,83	HG	< 25%
29	A	-	HG inv	> 75%
	B	13,20	HG inv	> 75%
30	A	-	HG inv	< 25%
	B	9,17	HG inv	Negative

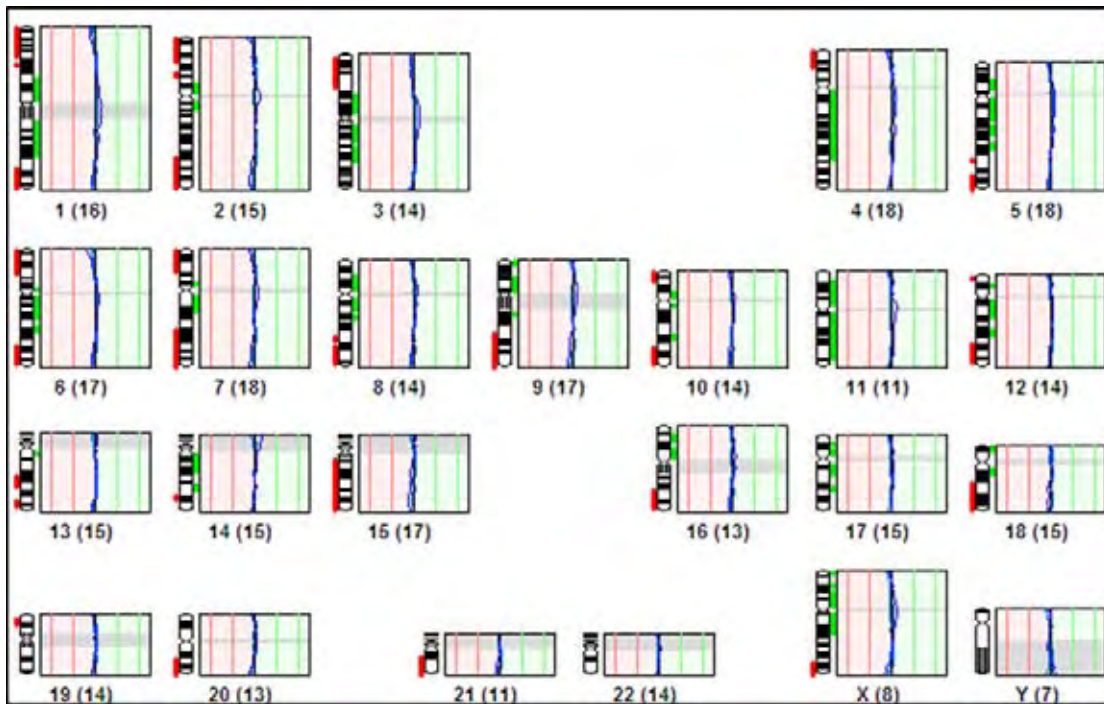
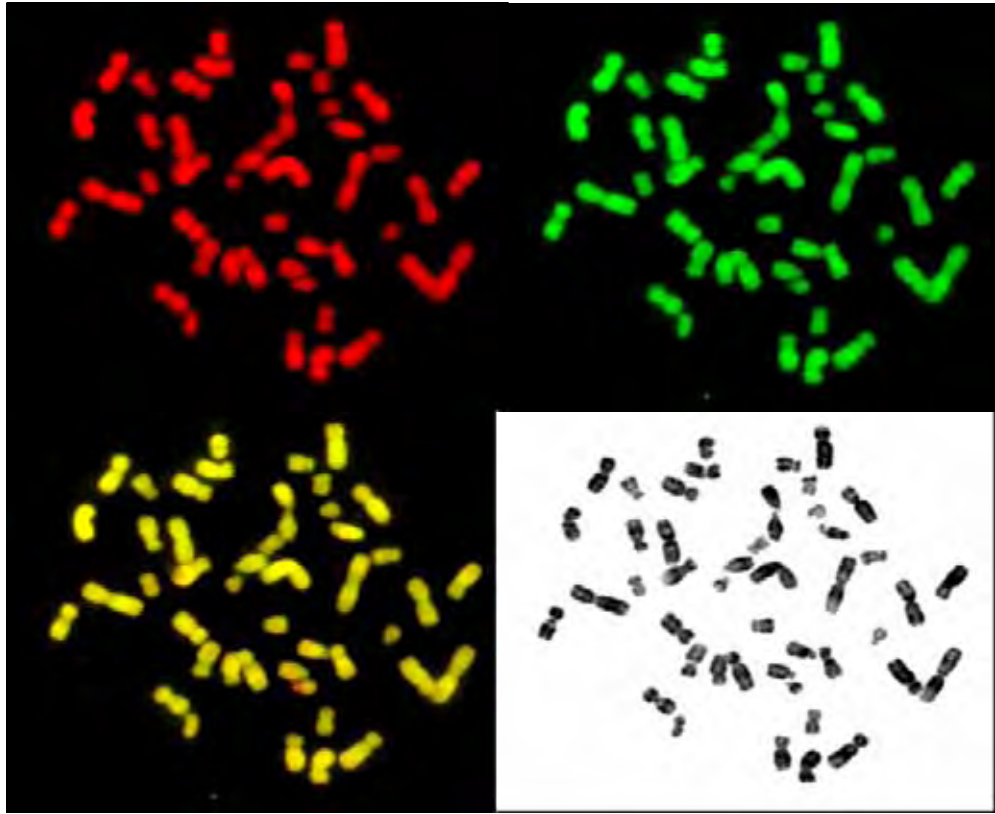
N: No neoplasia; LG: low-grade papillary carcinomas; HG: high-grade papillary carcinomas; HG inv: invasive high-grade papillary carcinomas.

**Table 5.** Frequency (%) of immunohistochemically p53-positive urothelial cells of patients with history of urinary bladder cancer.

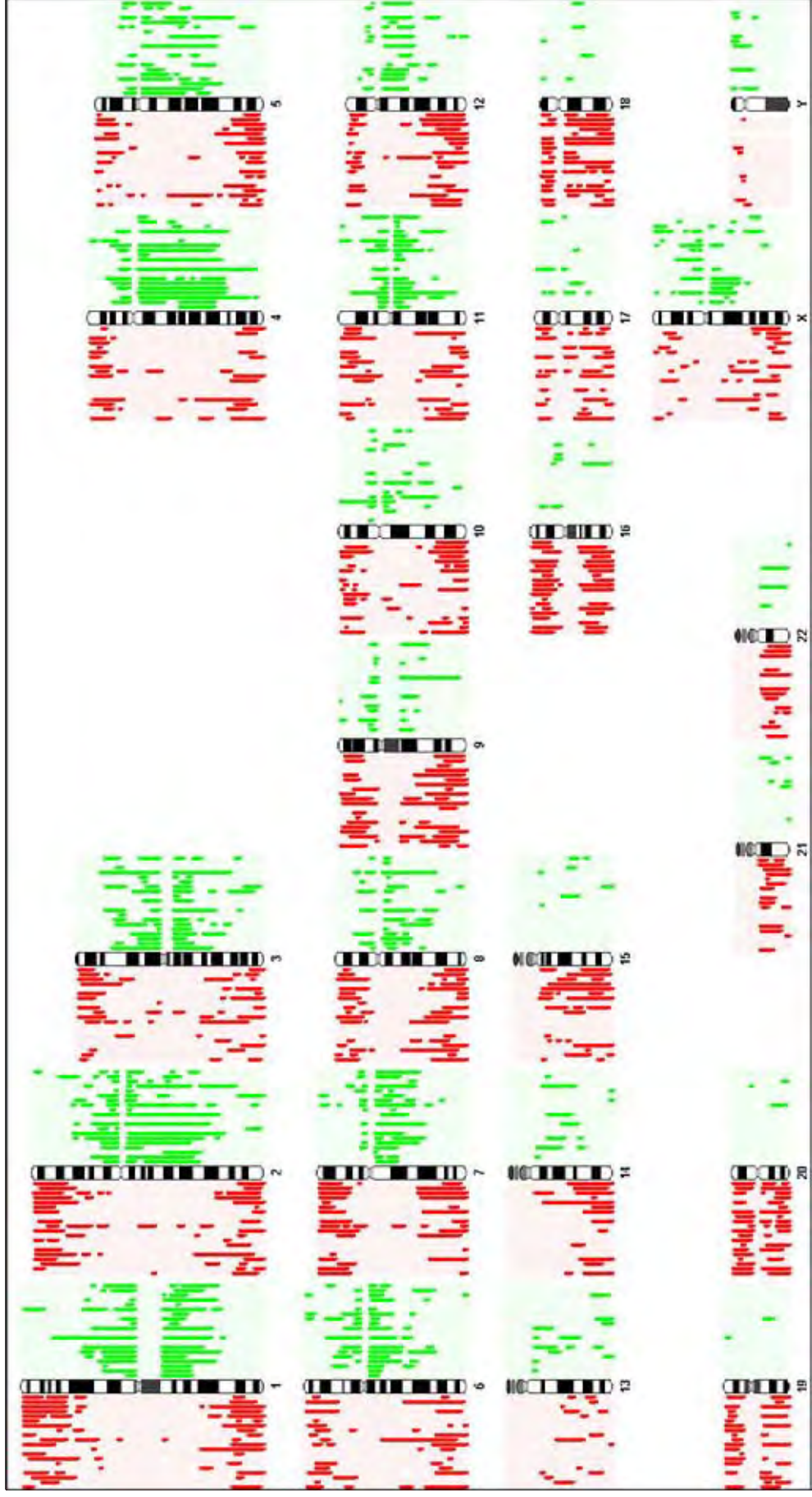
Histologic Diagnosis	p53-positive cells* (number of labeled cases/total number cases) <sup>1</sup>				
	0	<25%	<50%	<75%	>75%
“Free of neoplasia”	33 (5/15)	33 (5/15)	26 (4/15)	7 (1/15)	0
Low grade papillary carcinoma (LG)	2 (1/50)	48 (24/50)	30 (15/50)	18 (9/50)	2 (1/50)
High grade papillary carcinoma Non-invasive (HG)	11 (4/35)	43 (15/35)	23 (8/35)	9 (3/35)	14 (5/35)
High grade papillary carcinoma Invasive (HG inv)	4 (1/27)	49 (11/27)	12 (3/27)	12 (3/27)	28 (6/27)

\*Round values.

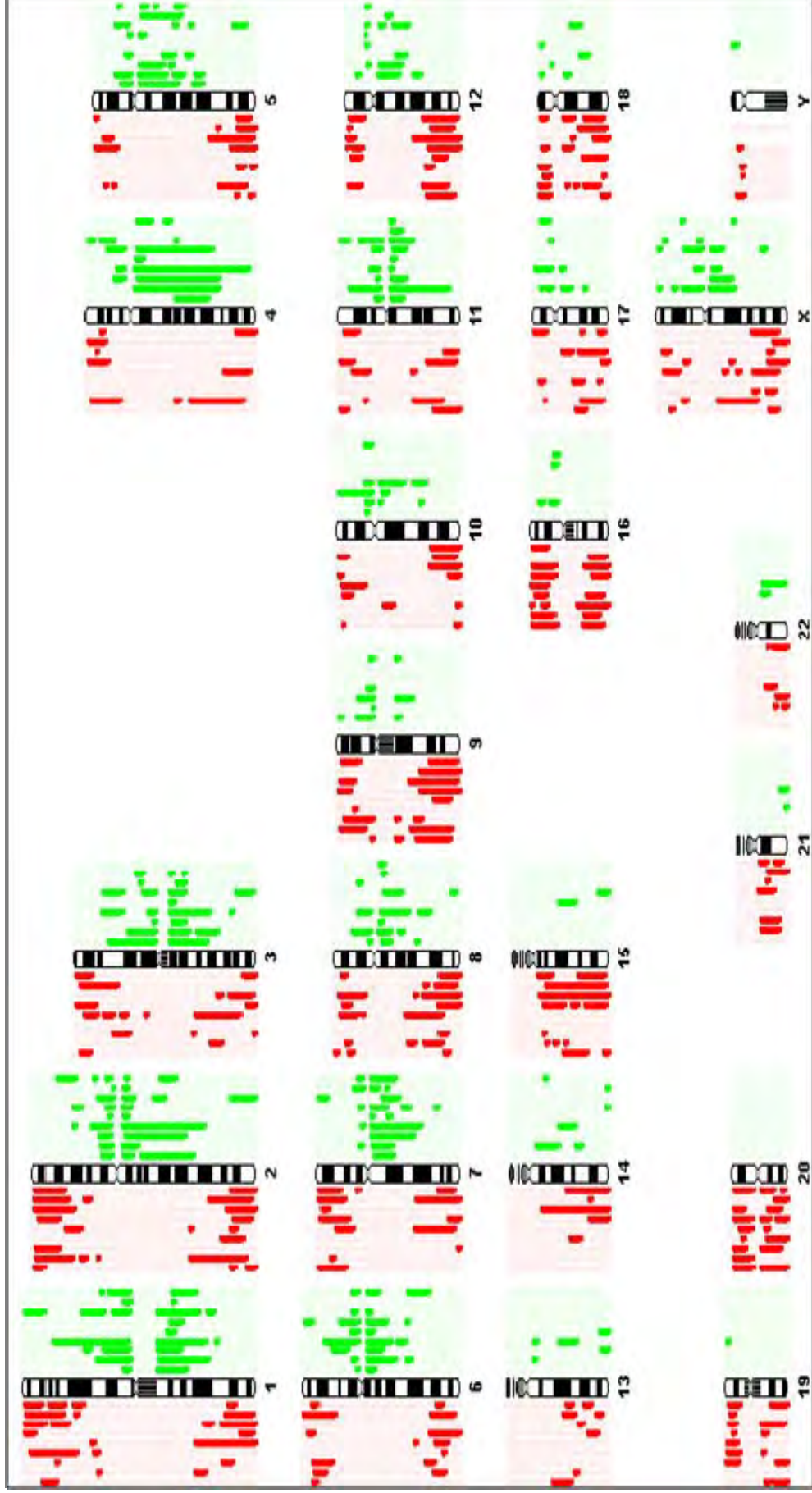
## **ANEXOS**



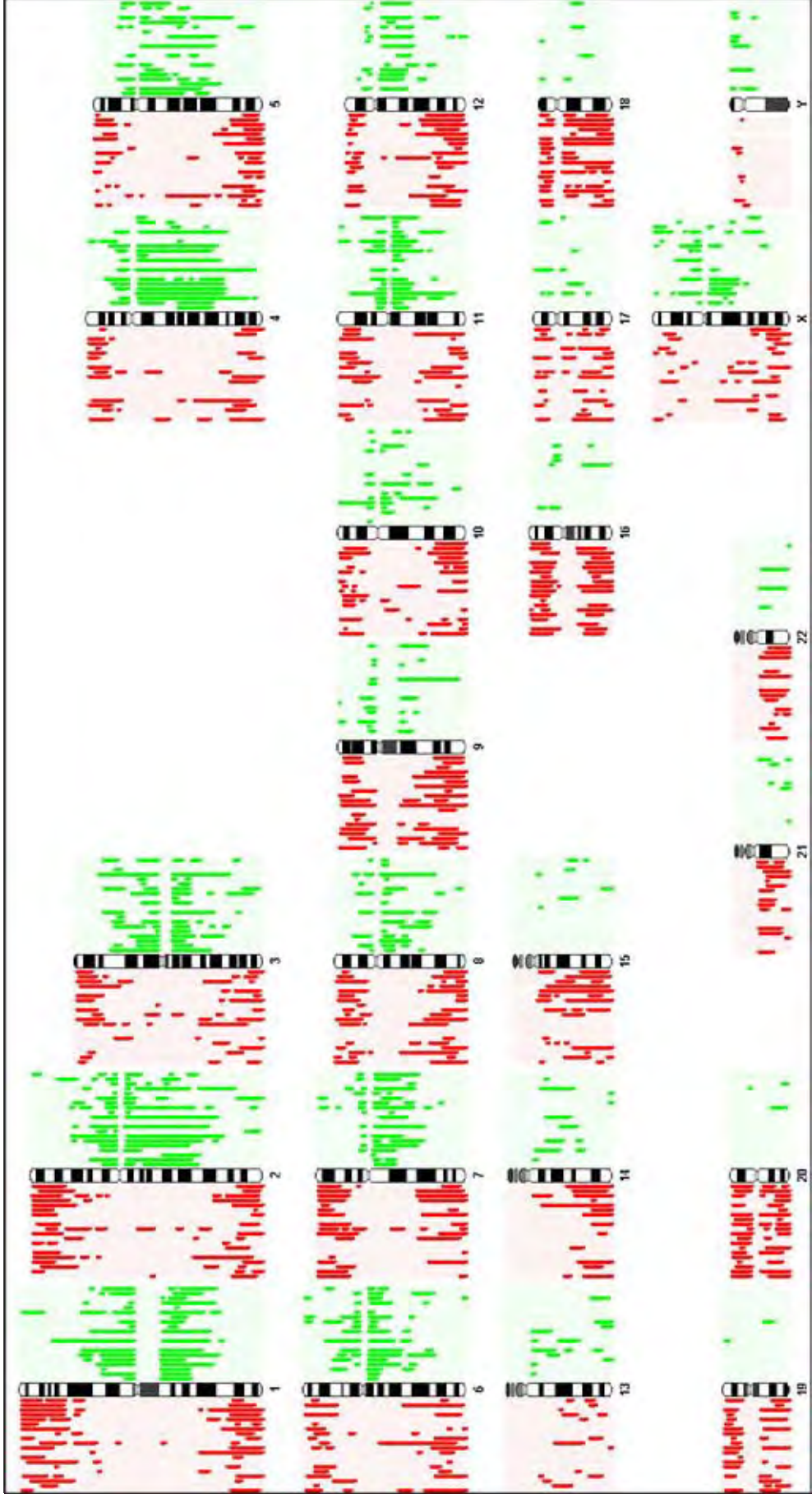
**Figura 1.** Padrão de marcação da HR-CGH para amostra de carcinoma urotelial marcada pela metodologia de SCOMP. A) Imagem capturada com filtro no espectro verde; B) Idem, no espectro vermelho; C) Idem, com filtro triplo e, D) padrão de banda GTG (DAPI-reverso), E) Perfil médio da HR-CGH. O desvio da linha azul para a esquerda indica perda (vermelho) e para a direita indica ganho (verde).



**Figura 2.** Ideograma demonstrando as regiões de perdas (vermelho) e ganhos (verde) genômicas nas amostras de carcinoma urotelial de baixo grau.



**Figura 3.** Ideograma demonstrando as regiões de perdas (vermelho) e ganhos (verde) genômicas nas amostras de carcinoma urotelial de alto grau.



**Figura 4.** Ideograma demonstrando as regiões de perdas (vermelho) e ganhos (verde) genômicas em todas as amostras de carcinoma urotelial utilizadas neste estudo.

**Tabela 6.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – paciente 1.

Cromossomo	Amostra A*		Amostra B*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p36.1-p36.3, q32-q44	p13-p21, q22-q31	p32-p36.3, q32-q44	p13-p31, q21-q31
2	q21, q35-q37	p12-p13, p24-p25, q11.2-q14.1, q22, q24-q31	p22-p25, q37	p11.2-p16, q12-q33
3	p24-p25, q24, q27-q29	p12-p13, p21, q13.1 -q13.2	p24-p25, q26.3-q29	p12, p14-p21, q13.1-q23
4	p15.1-p16, q21-q22, q27-q28, q31.3-q37	q12-q13	p16, q34-q35	p12-p15.2, q13-q21, q24-q31.1
5	p14, p15.2-p15.3, q21-q22, q33-q35	p12-p13, q11.2-q14	q31-q35, p15.3	p12-p14, q15-q23
6	p12-p21.1, p23-p25, q21, q22-q27	p21.3-p22, q12-q15	p23-p25, q25, q27	p12-p21.1, q12-q16
7	p14-p22, q36	p11.2-p12, q11.2-q22	p15-p22, q31-q36	p11.2, q11.2-q21
8	p21-p23, q23-q24.3	p11.2, q12	p21-p23	q12-q22
9	p13-p24, q32-q33, q34	p12, q21-q22	q32-q34	q12-q22
10	p12-p15, q22-q26	p11.2, q21	p12, p13-p15, q25-q26	q11.2-q21
11	p15, q21-q25	p11.2-p14, q12-q14	p14-p15, q25	p11.2, q12-q22
12	p12-p13, q22-q24.3	q12	q24.1-q24.3	p11.2-p12, q13-q23
13	-	-	-	q12-q14, q21
14	q22, q24-q32	-	q31-q32	-
15	q12-q13	q21-q22, q24	q22-q25	-
16	p12-p13.3, q21-q23	-	p12-p13.3, q22-q24	-
17	p11.2-p13, q21-q25	q12	p13, q22-q25	-
18	p11.2-p11.3, q22-q23	q12	p11.2-p11.3, q11.2-q23	-
19	p13.1-p13.3, q13.1-q13.3	-	p13.2-p13.3, q13.3-q13.4	-
20	p11.2-p13, q12-q13.3	-	p11.2-p13, q11.2	q13.2
21	q11.2-q22	-	-	-
22	q12-q13	-	q11.2-q13	-
X	p22.2-p22.3, q26-q28, q23-q24	-	-	p11.2-p21, q13-q21
Y	q11.1-q11.2	-	-	q11.2

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas



**Tabela 7.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – paciente 2.

Crom	Amostra A *			Amostra B *			Amostra C *		
	Perda	Ganho		Perda	Ganho		4575 Perda	Ganho	
1	p34.1-p36.3, q32-q44	p12-p31, q21-q31		p32-p36.2, q32-q43	p12-p22, q21-q24		p35-p36.3, q41	p13, q21-q23, q31	
2	p22-p25, q35-q37	p11.2-p13, q11.2-q32		p16-p24, q36-q37	p11.2-p14, q11.2-q24		p23-p25, q34	p11.2-p12, p14-p16, q11.2-q31, q32, q37	
3	p21-p25, q21-q24, q26.2-q29	p12-p13, q13.1-q13.3		p24-p25, q28	p12-p14, p14-p21, q12-q13.3, q23-q24		-	p12-p14, q13.1-q13.2, q23-q24, q26.1-q28	
4	p15.2-p16, q32-q35	p13, q12-q28		q32-q35	p12-p14, q12-q21, q24-q26, q27-q28		-	p12-p14, q12-q13, q21-q28	
5	p14-p15.3, q34-q35	q12-q23		p14-p15.3, q31-q35	p12-p13, q11.2-q22		p15.3, q32-q35	q14-q23	
6	p23, q23-q27	p12-p21.1, q12-q15, q21		p21.3-p25, q21-q27	q12-q14		-	p12, p21.3-p22, p24-p25, q12-q13	
7	p14-p22, q32-q36	q11.2-q21		p14, p15-p22, q31-q36	q11.2, q21		-	p12, p15, p21, q11.2-q22, q31	
8	p12-p23, q22-q24.3	-		p21-p23, q22-q24.3	p11.2-q12		-	p11.2-p12, q12, q23	
9	p12-p24, q21-q34	-		p21, q32-q34	p12, q13-q21		p21	p12, q21-q34	
10	p13, p15, q25-q26	p11.2, q21-q22		p12-p14, q24-q26	q21		p11.2, p12, p13-p14	q22-q23	
11	p12-p15, q21-q25	q12		p14-p15, q14-q25	p11.2, q12		q24-q25	p11.2-p14, q12-q14, q22	
12	p12-p13, q23-q24.3	q12-q15		p13, q21, q24.3	p11.2, q12-q14		p13	p11.2, q12-q15, q24.1, q24.3	
13	q34	q13-q14		q31-q32	q12		-	q12, q32-q34	
14	q32	q13-q22		q23-q24, q31-q32	q11.2, q12-q13		-	-	
15	-	-		q15-q21, q21-q26	-		-	-	
16	p11.2-p13.3, q13-q24	-		p12-p13.3, q12.1-q23	-		p13.1	p11.2, q13-q24	
17	p12-p13, q22-q25	-		p12, q22, q24	-		-	q21	
18	p11.2-p11.3, q11.2-q23	-		p11.2-p11.3, q12-q23	-		p11.2-p11.3	q11.2-q21, q23	
19	p13.1-p13.3, q13.1-q13.4	-		q13.3-q13.4	-		p13.1	q13.1	
20	p11.2-p13, q13.2-q13.3	-		p11.2-p13, q11.2-q13.3	-		p11.2-p12	q12-q13.3	
21	q21-q22	-		q11.2-q22	-		-	q22	
22	q11.2-q13	-		q11.2-q13	-		-	q11.2-q13	
X	q26-q27	p11.2-p21		p21-p22.1, q23, q25-q28	q12-q13, q21		-	p11.2-p11.3, q28	
Y	-	p11.2-p11.3, q11.1		p11.2, q11.2	p11.2, p11.3, q11.1-q11.2		-	p11.2-p11.3	

\* alterações presentes em 90% das metafases analisadas, Crom: cromossomos.

**Tabela 8.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – paciente 3.

Cromossomo	Amostra A*		Amostra B*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p31-p36.1, q41	q21-q24	p36.1-p36.2, q41, q43-q44	p13-p22, p31, q21-q31
2	p16-p24, q32, q36	p11.2, q11.2-q12, q14.3, q22	p23-p25, q37	p11.2-p15, q11.2-q24, q31, q32
3	p24, q26.1-q26.3	p21	p22-p25, q28-q29	p12, p13-p21, q13.1-q13.3, q24, q25
4	p14-p15.3, q31.2-q32	q23-q24, q28	p15.3-p16, q32-q34	p12-p14, q12-q31.1
5	p12-p13, q11.2, q14-q23, q31-q35	-	p14-p15.3, q34-q35	q11.2-q13
6	p12-p21.3	p24-p25, q12-q14, q27	p23	p12, p21.1-p21.3
7	p13-p15	q22	p15-p22, q34-q36	q11.2, q21-q31
8	p11.2-p21, q21.1-q24.1	-	p21-p23, q24.2-q24.3	q21.1-q22
9	p12-p22, q21-q22, q31-q34	-	p21-p23, q33-q34	p12-p13, q21, q22
10	q23-q25, q26	p11.2	p13, q25, q26	p11.2, q11.2, q21-q23
11	q14, q22-q23	p15, q12	p15, q23-q25	p11.2, q12-q13
12	q15-q24.1	-	q24-q24.3	p11.2-p12, q12-q14
13	q14	q32-q34	q31-q32	q13-q21, q24
14	q24-q32	-	q12-q14, q15, q24-q25	-
15	q24	q21-q22	p12-p13.3, q21-q24	-
16	q12.2-q22	-	q25	q11.2, q21
17	q22	-	p11.2, q11.2-q23	-
18	q12, q22	-	p13.3	-
19	q13.1-q13.3	-	q13.2-q13.3	-
20	p11.2-p12	q13.2-q13.3	q21-q22	-
21	-	q21	q12-q13	-
22	q11.2-q13	q13	p21, p22.3	-
X	q23-q24	p22.1-p22.3, q12	p21-p22.1, p22.3, q26-q27	q13, q21- q22
Y	-	p11.2-p11.3	-	p11.1-p11.2, q11.2

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas

**Tabela 9.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de baixo grau – pacientes 4, 5 e 6.

Crom	Paciente 4*		Paciente 5*		Paciente 6*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p13-p21, p22-p31, p32-p34.3, q21, q41	-	p31, p32-p36.3, q32-q44	q21	p31, p32-p33, q41-q43	-
2	p12-p21, p23, q13-q21, q23, q31-q32, q33	-	p16-p25, q33-q37	q21-q31	-	p11.2, p12-p13
3	p12, p22-p24, q13.1-q13.3, q24	-	p14-p21, p22-p25, q21-q25, q26.3-q29	q13.1	-	p21
4	p13-p14, p15.2-p16, q13-q21, q31.1-q31.3	-	p15.1-p16, q31.1, q32-q35	q13, q24-q28	-	-
5	p14, q21, q23, q33-q35	-	p15.2-p15.3, q32-q35	q15-q31	p12-p13, q11.2-q12	-
6	p22, q14-q26	-	p12, p22-p25, q16, q23, q25-q27	p21.3	p22-p23, q22	-
7	p11.2-p13, p14-p15, p15-p22, q21, q31, q36	-	p11.2-p22, q31-q36	-	-	q21, q32
8	p11.2-p12, p22, q22-q24.1	-	p11.2-p23, q23-q24.3	q12	p12	-
9	p13-p24, q21, q31	-	p23, q21-q22, q31-q34	p13	p12-p23, q21, q33	q24
10	q21-q22	-	p11.2-p15, q21-q26	-	-	q25-q26
11	p13, q14-q23	-	p13-p15, q14-q25	-	p13-p15	-
12	p12-p13, q12, q13-q21	-	p12-p13, q12-q13, q21-q24.3	-	q21, q24.3	-
13	q14-q22	-	q12-q21	q31	-	-
14	-	-	q11.2-q13, q23-q32	-	-	-
15	-	q12	q15-q22, q24-q26	-	-	-
16	p11.2, p12-p13.3, q12.2-q24	-	p11.2-p13.3, q13-q24	-	p12-p13.1, q22	-
17	p11.2, q11.2-q12	-	p11.2-p13, q11.2-q25	-	-	-
18	p11.2, q11.2-q12	-	p11.2-p11.3, q11.2-q23	-	p11.2-p11.3	-
19	p13.1-p13.2	-	p13.2-p13.3, q13.1-q13.4	-	p13.1-p13.3	-
20	p11.2, q11.2, q13.1-q13.3	-	p11.2-p13, q13.1-q13.3	-	p11.2-p13, q13.2	-
21	q21	-	q11.2-q22	-	-	-
22	q11.2-q13	-	q11.2-q13	-	-	-
X	p21, q21, q22-q25, q26-q27	-	p11.2, pp11.4, p21-p22.1, q26-q28	q21	p11.2, q22-q24	-
Y	-	-	q11.1-q11.2	-	p11.2-p11.3	-

\* alterações presentes em 90% das metafases analisadas

**Tabela 10.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 7.

Cromossomo	Amostra A*		Amostra B*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p33-p35	p12-p21, p22, q22-q31	p22, p31-p36.1	q22-q24
2	p24-p25, q35-q36, q37	p11.2-p12, p13, p16-p22, q12, q22-q33	q34-q36	p11.2, p16, q11.2-q12
3	p24-p25	p12	-	p12, p21, q13.1-q13.3, q26.3-q29
4	-	q12-q13, q22-q23	-	p11-p15.1, q12-q28
5	q33, q35	p13, q11.2-q12, q13, q15-q21	q33-q34	-
6	p23	p12, q12-q14, q22-q23	q25	p12-p21.1, p23-p25, q12-q15
7	p14-p22	p12, q11.2-q21	-	p11.2-p12, q11.2, q32-q33
8	p21, p23, q24.1	q12	-	p12, q12-q13
9	q21, q22-q34	-	p21, q21	-
10	p14, q26	-	p12-p14	q21-q22
11	p15, q23-q25	q12	-	p11.2-p12, q12-q13
12	q22-q24.3	p11.2	q22-q23	p11.2
13	q21	-	-	q12
14	-	q13	q23-q24	q32
15	q21-q24, q26	-	-	q12, q13, q26
16	p11.2-p13.3, q21-q24	-	p12-p13.2, q21-q23	p11.2
17	q21-q22	p11.2-p12	p12-p13, q11.2-q12, q21-q22	-
18	p11.2-p11.3, q22-q23	-	p11.2-p11.3	-
19	q13.1-q13.2, q13.3-q13.4	-	p13.1-p13.3, q13.1	-
20	p11.2-p13, q11.2-q13.3	-	p12, q11.2-q13.3	-
21	-	-	-	-
22	-	-	q13	-
X	p22.1, q26-q27	p21, q21	-	p11.2-p11.4, p22.1-p22.3, q13
Y	p11.1-p11.2, q11.1	-	-	p11.1-p11.2

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas

**Tabela 11.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 8.

Cromossomo	Amostra A*		Amostra B*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p36.1-p36.3, q42-q44	p12-p34.1, q21-q31, q32	p22, q31, q32-q44	p13, q22
2	p22-p24, q36-q37	p11.2-p13, p16, q11.2-q32	p16-p21, p23, q35-q36	p11.2, q11.2-q12, q37
3	p23-p26, q28-q29	p12, p21, q13.1-q24, q26.1-q26.2	p14, p21, p23-p24, q22-q26.3	q13.1
4	p15.1-p16	p12-p14, q12-q34	q31.3-q35	q13
5	p14-p15.3, q32-q35	p13, q14, q21	-	-
6	p23-p24, q24-q27	p12-p22, q12-q16, q21	q24-q25	q12-q15
7	p14-p22, q35-q36	p11.2-p31	p12-p15, q31-q36	q11.2
8	p21-p22, q23-q24.3	p12, q12-q21.2, q22	p21-p22, q21.1-q23	-
9	p21-p24, q22, q34	p12-p13, q21	q31-q34	p12, q21
10	p15, q26	p11.2, q11.2-q21, q22-q23	p12-p14	-
11	p15, q22-q25	p11.2-p12, q12	p13-p14, p15	q12
12	p12-p13, q22-q24.3	q14-q15	p12-p13, q23-q24.1	p11.2
13	q32-q33	q12, q21-q22	-	q33-q34
14	q31-q32	q21-q24	-	-
15	q14-q21, q22, q24-q26	-	-	q21-q22
16	p11.2-p13.2, q22-q24	-	p12-p13.3	-
17	q25	p11.2-p13, q11.2	-	-
18	p11.2-p11.3, q11.2-q12	q21	q21-q23	p11.3
19	p13.2, q13.1	p13.3	p13.2-p13.3	-
20	p11.2-p13, q11.2-q12, q13.1-q13.3	-	p11.2-p12	-
21	q21	-	-	q22
22	-	q11.2-q13	q12	-
X	p11.4, q21, q26-q28	p11.2, q12-q13	p21-p22.2, q21, q24-q27	-
Y	p11.2	-	-	p11.2-p11.3

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas

**Tabela 12.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 9.

Cromossomo	Amostra A*		Amostra B*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p33, q32-q41	p13-p21, p22-p31, p35-p36.3	p32, p36.1-p36.2, q31, q32-q44	p13-p21, p31, q21-q34
2	p22-p24	p11.2-p13, q12-q13, q21-q22, q35-q37	p22-p25, q35-q37	p11.2-p13, q12-q24
3	p14-p21, q21, q29	p12, q13.2-q13.3	p24, q25-q29	q12-q13.3
4	-	p14-p16, q24	p15.3	p12-p14, q12-q31.1
5	-	p12, p13-p14, q15, q22, q33-q34	q31-q35	p12, q11.2-q14
6	p21.3-p23, q23-q24	p12, q12	-	p21.1-p22, q12-q14
7	q36	p21-p22, q11.2-q21	p21	q11.2-q22
8	q23-q24.1	p12	p11.2-p23, q21.3, q22-q24.3	-
9	p12-p23, q21, q22	-	p21-p24, q22-q34	-
10	q11.2-q21, q26	-	q24-q26	p11.2-p15, q11.2
11	-	p11.2-p14, p15, q12-q13	q23-q25	q12-q13
12	-	p11.2, q12, q14-q15	p12-p13, q21-q24.3	p11.2, q12-q14
13	-	-	-	q34
14	-	-	q13-q32	-
15	q13-q14	-	q11.2-q26	-
16	p12-p13.1, p13.3, q12.2-q24	p11.2	p11.2-p13.3, q21-q24	-
17	-	-	q11.2-q21, q24-q25	-
18	p11.2-p11.3, q23	q12-q21	q22-q23	p11.2
19	p13.1-13.3, q13.3-q13.4	-	p13.2-p13.3, q13.1-q13.4	-
20	p12-p13, q11.2-q13.2	-	p12-p13, q12-q13.2	-
21	q21-q22	-	q21	q22
22	q13	-	q13	q11.2
X	q24, q26	p11.2, p22.1	q26	p11.2, q21
Y	p11.2	-	-	-

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas

**Tabela 13.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 10.

Cromossomo	Amostra A*		Amostra B*	
	Perda	Ganho	Perda	Ganho
1	p31, p32-p36.3, q32-q44	p12-p22, q21-q31	p31, p32-p36.3, q32-q43	p13, q21-q25
2	p15, p21-p25, q32-q37	p11.2-p13, q11.2-q14.1	p21-p25, q35-q37	p11.2-p12, q11.2-q12, q21-q24, q24-q31
3	p21-p24	p12-p14, q13.1-q21, q22-q25	p24-p25, q27-q29	p11-p13, p14-p21, q12-q24
4	p15.1-p16	q12-q31.2	p15.3, q32-q35	q24-q28
5	q34-q35	p12-p14, q11.2-q14, q15-q21, q23	p15.3, q32-q34	p12, q11.2-q14, q22
6	p21.3-p25, q24-q27	p12, q12-q16, q22	p23, q24-q25	p12, q12-q13
7	p15-p22, q31-q36	p11.2-p12, q11.2	p15-p22, q32-q36	q11.2-q21
8	p22, q24.1-q24.2	p11.2-p12, q11.2-q13, q21.1, q21.3-q22	p22, q23-q24.3	q12-q13, q21.3
9	q22-q34	p12-p21, p24	p21-p23, q31-q34	-
10	p13-p14, q24-q26	p11.2, q11.2, q23	q24-q26	-
11	-	p11.2-p13, p14-p15, q12-q24	p14-p15	p11.2-p12, q12-q13
12	q23-q24.3	p11.2-p12, q12-q13	p12-p13, q21-q24.3	-
13	q21-q22, q33	q12	q21, q31-q32	-
14	-	q12, q21, q24	q22-q32	-
15	q13-q26	-	q12-q15, q22-q26	-
16	q22-q24	p11.2, p13.1	p12-p13.3	-
17	-	p11.2, p12, q11.2-q21	p11.2-p13, q22, q24-q25	-
18	q12-q23	p11.3, q12	p11.2-p11.3, q12, q21-q23	-
19	p13.2-p13.3, q13.3-q13.4	-	p13.2-p13.3, q13.2-q13.4	-
20	q13.1-q13.3	q11.2	p11.2-p13, q11.2-q12, q13.2-13.3	-
21	q21-q22	-	q21, q22	-
22	-	-	q12, q13	-
X	q27-q28	p11.2-p21, p22.3, q13-q21	q23-q28	-
Y	q11.2	-	-	-

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas

**Tabela 14.** Regiões comuns de perdas e ganhos genômicas em carcinoma urotelial de bexiga de alto grau – paciente 11.

Cromossomo	Perda	Ganho
1	p22, q31	p13, q23
2	p13, p15, p21-p25, q31-q37	p11.2, q11.2-q12
3	q24-q25	p13, q13.1, q13.3
4	p13-p16, q24, q26-q33	q12
5	p14, p15.1, q31-q34	q11.2-q21
6	p22-p23, q24-q25	-
7	p21	p12-p13, q11.2, q21
8	p21-p22, q21.3, q22-q23	q12
9	p13-p23, q22-q34	p12, q21
10	-	p11.2, q11.2
11	p13, q14-q23	q12-q13
12	p12-p13, q22-q24.2	q13
13	q22	-
14	-	q32
15	q14, q15, q21	-
16	p11.2-p13.3, q21-q23	-
17	p12, q22-q25	-
18	p11.2-p11.3, q12, q21-q22	-
19	-	-
20	p11.2-p13	-
21	q21-q22	-
22	-	-
X	p11.4-p21, q13-q24	-
Y	-	-

\* alterações presentes em 90% das metáfases analisadas



**Explicação ao paciente**

A sociedade atual apresenta alta taxa de doenças degenerativas crônicas, como doenças do coração, hipertensão e câncer, entre outras intimamente relacionadas aos hábitos de vida de cada pessoa, como consumo de cigarros, bebidas alcoólicas, má alimentação, contato com substâncias tóxicas (solventes de tintas, pesticidas) etc.

O tumor de bexiga é uma doença que está relacionada principalmente a esses hábitos de vida inadequados, pois as substâncias contidas no cigarro, por exemplo, podem alterar o DNA e com o tempo provocar o desenvolvimento do tumor. Desta forma, é importante analisar essas alterações, pois elas podem indicar um risco de desenvolvimento ou reaparecimento do tumor e, ainda, sugerir formas de tratamento.

Em decorrência disto, o (a) Sr(a) está sendo convidado a participar de um estudo, para investigar se existem alterações no material genético das suas células de bexiga.

**Caso aceite o convite, parte do lavado de bexiga que o médico responsável já retirou do(a) Sr(a) para a avaliação de rotina (por exemplo, verificar se há inflamação na bexiga ou a presença de células tumorais) será usado em nosso estudo, não havendo nenhum desconforto adicional ou complicações para o (a) Sr(a), pois aproveitaremos apenas parte da biópsia e do lavado, que será coletado de qualquer maneira pelo clínico responsável. Além disso, será apresentado ao Sr(a) um questionário, no qual o(a) senhor(a) poderá nos informar sobre seus hábitos de vida.**

TUDO O MATERIAL UTILIZADO NESTE PROJETO DE PESQUISA PERMANECERÁ ESTOCADO EM UM BANCO DE DADOS E, POSSIVELMENTE, PODERÁ SER REMANIPULADO.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### I. Identificação do Paciente (Voluntário)

Nome:		
RG:	Código (não preencher) :	
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

### II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1- Título do Protocolo da Pesquisa: "Lesões genômicas em momentos sucessivos do carcinoma urotelial de bexiga humana".
- 2- Pesquisadores responsáveis: Merielen Garcia Nascimento, Dr João Lauro Viana de Camargo, Dra. Silvia Rogatto, Biomédica Luciana Scudeletti Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, Dr José Carlos de Souza Trindade Filho e Dr Carlos Márcio Nobrega de Jesus (urologistas responsáveis).
- 3- Avaliação de risco da Pesquisa: sem risco, visto que aproveitaremos o material de arquivo e parte do lavado já coletado pelo médico responsável, não havendo coletas adicionais unicamente para a pesquisa.

### III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

- 1 - Justificativa e Objetivos da Pesquisa: Os pacientes que foram submetidos à cirurgia para retirada de tumor de bexiga apresentam risco aumentado de desenvolvê-lo novamente, por isso são realizados lavados vesicais periódicos e coleta de biópsia para controle. Desta forma, propomo-nos avaliar **possíveis** alterações no DNA das células da bexiga que possam indicar, **precocemente**, desenvolvimento ou reaparecimento do tumor.
- 2 - Procedimentos utilizados: utilização de parte das biópsias e do lavado da bexiga, já coletado pelo médico para as avaliações de rotina.
- 3 - Desconfortos e riscos: não haverá desconforto físico adicional, além do procedimento de coleta de lavado que seria realizado de qualquer maneira pelo clínico.
- 4 - Benefícios que poderão ser obtidos: Possível contribuição **futura** para o diagnóstico precoce do tumor e melhora da qualidade de vida dos pacientes.
- 5- Procedimentos vantajosos para os indivíduos: avaliação de **possíveis** alterações que possam estar relacionadas ao desenvolvimento ou reaparecimento do tumor.

### IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?  
[  ] SIM [  ] NÃO
- 2- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.  
[  ] SIM [  ] NÃO
- 3- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?  
[  ] SIM [  ] NÃO

- 4- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 5- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 6- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?  
 SIM  NÃO
- 7- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?  
 SIM  NÃO

TODO O MATERIAL UTILIZADO NESTE PROJETO DE PESQUISA PERMANECERÁ ESTOCADO EM UM BANCO DE DADOS E, POSSIVELMENTE, PODERÁ SER REMANIPULADO.

## V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, \_\_\_\_\_ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Paciente **ou** Responsável

## VI - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Nome: Dr. João Lauro Viana de Camargo  
Endereço: Depto. de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N, Botucatu - SP  
Telefone: (14) 3811-6238 (ramal – 215) / (14) 3882-8255

Nome: Merielen Garcia Nascimento  
Endereço: Depto. de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N, Botucatu - SP  
Telefone: (14) 3882-8255

Nome: Dra. Silvia Rogatto  
Endereço: Laboratório Neogene, Depto. de Urologia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N, Botucatu – SP.  
Telefone: (14) 3811-6436

Nome: Dr. José Carlos de Souza Trindade Filho e Dr Carlos Márcio Nóbrega de Jesus  
Endereço: Depto de Urologia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N, Botucatu – SP  
Telefone: (14) 3811-6271