

Lucimari Bizari

**Detecção de Aneuploidias pela Técnica Fish
em Núcleos Interfásicos de Lesões da Bexiga**



1910000952



Lucimari Bizari

**DETECÇÃO DE ANEUPLOIDIAS PELA TÉCNICA
FISH EM NÚCLEOS INTERFÁSICOS
DE LESÕES DA BEXIGA**



952/00

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP
2000

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto, com bolsa do CNPq e auxílio financeiro da CAPES.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva



Lista de Abreviaturas

BXC: Cistites

BXD: Descamação da bexiga

BXN: Tecido da bexiga macroscopicamente normal

BXT: Carcinomas da bexiga

CAI: Carcinoma anaplásico indiferenciado

CCI: Cistite crônica inespecífica

CCT: Carcinoma de células transitórias

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto, com bolsa do CNPq e auxílio financeiro da CAPES.

LFT: Linfócitos

M: Masculino

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PHA: Fito-hemaglutinina

Rec: Recidiva

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa

s: Desvio

TNM: T=extensão clínica do tumor primário

N=envolvimento de linfonodos

M=metástases distantes

$\bar{x}$: Média

χ^2 : Qui-quadrado

WHO: World Health Organization

Lista de Abreviaturas

BXC: Cistites

BXD: Descamação da bexiga

BXN: Tecido da bexiga macroscopicamente normal

BXT: Carcinomas da bexiga

CAI: Carcinoma anaplásico indiferenciado

CCI: Cistite crônica inespecífica

CCT: Carcinoma de células transicionais

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

EGF-R: Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico

F: Feminino

FISH: Hibridação *in situ* fluorescente

GL: Grau de liberdade

HGC: Hibridação Genômica Comparativa

LFT: Linfócitos

M: Masculino

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PHA: Fito-hemaglutinina

Rec: Recidiva

RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa

s: Desvio

TNM: T=extensão clínica do tumor primário

N=envolvimento de linfonodos

M=metástases distantes

x: Média

X²: Qui-quadrado

WHO: World Health Organization

Agradecimentos

Gostaria de agradecer o auxílio de muitas pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho:

À Profa. **Dra. Ana Elizabete Silva**, pela amizade, paciência e dedicação com que me orientou, possibilitando a concretização do trabalho;

Às Profa. **Dra. Lúcia Regina Martelli** e Profa. **Dra. Eny Goloni Bertollo**, por terem aceito participar da banca examinadora, pela leitura cuidadosa da pró-forma, enriquecendo muito o trabalho ora realizado;

Aos médicos **José Carlos Mesquita**, **Eliseu Denadai** e **Antonio Barbosa** pelo apoio e colaboração no envio das amostras e esclarecimentos durante a elaboração da dissertação;

Às amigas **Dra. Andréa Borducchi Carvalho Franco Salles** e **Dra. Nilce Barril**, pela orientação e auxílio durante a parte experimental do projeto, pela implantação da técnica FISH neste laboratório, enfrentando obstáculos maiores;

À amiga de laboratório **Ana Cristina Gobbo César**, pelas palavras de incentivo, nos momentos de desânimo e auxílio durante a contagem das lâminas;

À Profa. **Dra. Marileila Varella Garcia**, pelo envio das sondas, além da ajuda prestada durante a realização do trabalho;

À Professora **Adriana Barbosa dos Santos** e ao Professor Dr. **Antonio José Manzato**, pelo auxílio prestado na análise estatística;

À Professora **Dra. Eloiza Helena Tajara**, pelas sugestões preciosas durante a realização deste trabalho;

Ao amigo e funcionário **Josué Rodrigues dos Santos**, pela amizade, apoio e disposição que sempre me dispensou;

À Profa. **Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto**, pela gentileza na revisão do Abstract;

Aos funcionários da biblioteca, pela competência e dedicação nos serviços de comutação bibliográfica;

Ao serviço de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pela atenção dispensada durante a realização deste trabalho;

À todos os amigos do curso de Pós-graduação, pela amizade e incentivo. Em especial à **Marcos, Flávia e Alessandra**.

Aos meus irmãos **Ivan e Letícia**, pelo carinho, amizade e incentivo, que me estimularam muitas vezes, nos momentos de desânimo;

Aos meus pais **Antonio Aparecido Bizari e Célia Maria Frigério Bizari**, pela formação que me proporcionaram;

Ao **Silvio**, meu esposo, pelo amor, incentivo e paciência demonstrada todas as vezes que abri mão de sua companhia em favor dos livros;

À **Deus**, por estar sempre presente, tornando possível a realização de mais esse trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Célia, que se dedicam incondicionalmente ao estudo dos filhos.

Ofereço....

A procura da verdade é, por um lado, difícil e, por outro, fácil, já que nenhum de nós poderá desvendar-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.

(Aristóteles, 350aC)

Aos meus pais, **Antonio e Célia**, que se dedicam incondicionalmente ao estudo dos filhos.

Ofereço....

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos anatômicos e patológicos da bexiga.....	1
I.2. Epidemiologia do câncer da bexiga.....	7
I.3. Mecanismos moleculares da transformação maligna da bexiga.....	10
I.4. Alterações citogenéticas em câncer da bexiga.....	18

II. OBJETIVOS.....24

" A procura da verdade é, por um lado, difícil e, por outro, fácil, já que nenhum de nós poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá" (Aristóteles, 350aC).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Metodologia para estudo citogenético.....	28
III.2.1. Método para obtenção de núcleos interfásicos a partir de tecido.....	28
III.2.2. Método para obtenção de núcleos interfásicos a partir de tecido.....	28
III.2.3. Método para obtenção de células de descamação da bexiga.....	29
III.2.4. Método para obtenção de células de descamação da bexiga.....	29
III.3. Análise ao microscópio.....	32
III.4. Análise estatística.....	32
III.5. Análise estatística.....	33

IV. RESULTADOS.....34

V. DISCUSSÃO.....54

VI. CONCLUSÕES.....72

VII. RESUMO.....73

VIII. ABSTRACT.....75

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77

ANEXO.....93

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

I.1. Aspectos anatômicos e patológicos da bexiga.....	1
I.2. Epidemiologia do câncer da bexiga.....	7
I.3. Mecanismos moleculares da transformação maligna da bexiga.....	10
I.4. Alterações citogenéticas em câncer da bexiga.....	18

II. OBJETIVOS.....24

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Caracterização das amostras.....	25
III.2. Metodologia para estudo citogenético.....	28
III.2.1. Cultura de linfócitos.....	28
III.2.2. Método para obtenção de núcleos interfásicos a partir de tecido fresco.....	28
III.2.3. Método para obtenção de células de descamação da bexiga.....	29
III.2.4. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente - FISH.....	30
III.3. Análise ao microscópio.....	32
III.4. Critérios para contagens dos núcleos.....	32
III.5. Análise estatística.....	33

IV. RESULTADOS.....34

V. DISCUSSÃO.....54

VI. CONCLUSÕES.....72

VII. RESUMO.....73

VIII. ABSTRACT.....75

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....77

ANEXO.....93

I. Introdução

I.1. Aspectos anatômicos e patológicos da bexiga

A bexiga é um órgão que compõe o sistema urinário, juntamente com os rins, os ureteres e a uretra. Ela apresenta formato esférico e tem capacidade para armazenar até 400cc de urina (www.urolog.nl). Está situada profundamente no interior da pelve, constituindo uma estrutura extraperitoneal. Basicamente a bexiga é formada por duas partes: uma área triangular próxima à sua entrada, denominada trígono, onde desembocam ambos os ureteres e a uretra, e a outra constituída pelo músculo detrusor, músculo liso da parede da bexiga, que forma a sua porção principal (Jacob, 1974). O trígono é a região sensível da bexiga, que envia os sinais nervosos para o cérebro de que a bexiga está cheia. Os ureteres desembocam na bexiga em posição diagonal, funcionando como válvulas e impedindo o refluxo de urina para os rins quando ela atinge sua capacidade máxima (www.urolog.nl).

A principal função da bexiga é armazenar e excretar a urina produzida pelos rins. Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de armazenamento da urina pela bexiga foi muito importante, permitindo ao homem a detenção da urina até encontrar um local adequado para seu esvaziamento. Caso contrário, o espalhamento do cheiro humano tornaria o homem presa fácil para os animais carnívoros (www.urolog.nl).

Histologicamente, a bexiga é revestida por um epitélio de transição uniforme contínuo com o dos ureteres e da uretra, disposto sobre uma fina lâmina basal. Na espécie humana, a mucosa urinária normal raramente tem mais do que sete a oito camadas de células de espessura e consiste de três zonas. A zona superficial é formada por uma camada única de células grandes e achatadas, denominadas células "guarda-chuva". A zona intermediária contém quatro a cinco camadas de células quando a bexiga está distendida e seis a oito quando está completamente contraída. A zona basal consiste de uma camada única de pequenas células, que adquire a forma cilíndrica na bexiga contraída e achatada na bexiga distendida. Nos estados inflamatórios, pré-neoplásicos e neoplásicos, é observado espessamento dessa camada mucosa e irregularidades das células, assim como, do tamanho e da

forma do núcleo. Esta atipia celular é um antecedente quase invariável ao desenvolvimento de neoplasias (Cotran *et al.*, 1991).

Os tumores da bexiga podem ter origem urotelial ou mesenquimal, nesses casos podendo ser mioblásticos, fibroblásticos ou endoteliais. A classificação dessas neoplasias pode ser observada na Tabela 1.

Aproximadamente 95% das neoplasias da bexiga são de origem urotelial, sendo os 5% restantes de origem mesenquimal. A maioria dos tumores epiteliais são malignos e apresentam grande interesse clínico, pois são tumores freqüentes e apesar de apresentarem inicialmente baixo grau, freqüentemente são múltiplos e recidivantes (Cotran *et al.*, 1991; De-Vita *et al.*, 1997).

As lesões mucosas benignas da bexiga são representadas pelos papilomas de células transicionais, que podem originar-se em qualquer local do interior da bexiga, sendo difícil sua distinção dos carcinomas papilares grau I. Essas lesões são bastante raras, representando 2% dos casos de tumores da bexiga. Os papilomas podem surgir como lesões únicas de 2 a 5 cm de diâmetro ou como lesões múltiplas e seqüenciais em localizações variadas (Rubin & Farber, 1990; Cotran *et al.*, 1991). Esse tipo de tumor é pequeno, ramificado, mole e inserido na superfície da bexiga por um pedúnculo. O núcleo central das papilas é formado por tecido fibroso recoberto por células de transição (Cotran *et al.*, 1991).

A maioria dos carcinomas desenvolve-se a partir de doenças uroteliais pré-invasivas e pré-neoplásicas. Parece que há uma progressão de urotélio normal para carcinoma *in situ* ou outros estádios anteriores ao desenvolvimento tumoral: hiperplasia, hiperplasia atípica ou displasia. Na hiperplasia ocorre um aumento no número de células sem a perda da polaridade, assim como, crescimento nuclear e expressão de vários graus de polimorfismos. Na displasia ocorre perda da polaridade celular, aumento do núcleo e granulação da cromatina (www.cancer.med.upenn.edu, 1999) sendo observada freqüentemente em pacientes com carcinoma *in situ* e câncer invasivo, parecendo ser um precursor desses estádios neoplásicos. O período de progressão de displasia para carcinoma *in situ* e invasivo é variável. Cheng *et al.* (1999) após monitoramento em 36 pacientes com tumores da bexiga observaram uma variação desse intervalo de seis meses a oito anos.



Tabela 1. Classificação dos tumores epiteliais e mesenquimais da bexiga e suas respectivas freqüências, modificada de Cotran *et al.*, 1991.

Origem	Freqüências	Tipo histológico
Epitelial	95%	
Benigno	2%	Papiloma de células transicionais
Maligno	90%	Carcinoma de células transicionais
		Grau I
		Grau II
		Grau III
		Grau IV
	3%	Carcinoma <i>in situ</i>
	6-8%	Carcinoma de células escamosas
	2%	Adenocarcinoma
	5%	Carcinoma misto
	Indeterminada	Carcinoma indiferenciado
Mesenquimal	5%	
Benigno	1-5%	Leiomioma
Maligno	Indeterminada	Rabdomiossarcoma

O tipo histológico predominante do tumor epitelial maligno da bexiga é o carcinoma de células transicionais, correspondendo a 90% das neoplasias uroteliais (WHO, 1997; Srougi, 1998).

A graduação dos carcinomas de células transicionais é baseada no grau de atipia exibida pelas células neoplásicas. Esses carcinomas podem variar de lesões não-invasivas à invasivas, de planas à papilares e de bem diferenciadas (grau I) até cânceres agressivos, altamente anaplásicos (graus III e IV). O grau I apresenta células tumorais quase sempre papilares, com alguma atipia, porém, são bem diferenciadas e lembram as células de transição normais, as mitoses são raras e há aumento significativo do número de camadas de células, isto é, mais de sete camadas. O grau II exibe células tumorais na sua maioria papilares, podendo também ser planas, ainda reconhecíveis como de origem transicional, o número de mitoses está aumentado e o número de camadas de células aproxima-se de dez. Tanto os tipos papilares como os planos podem ser invasivos ou não-invasivos, as neoplasias papilares têm complicada estrutura de samambaia, compostas de um delicado talo de tecido conjuntivo, coberto por um epitélio de transição. Nos graus III e IV, as células tumorais dificilmente são reconhecidas como de origem transicional, o número de camadas de células também está aumentado e o número de mitoses é grande. As lesões de graus III e IV, são na maioria planas, vegetantes, necróticas e algumas vezes ulcerosas (Cotran *et al.*, 1991).

O carcinoma de células transicionais apresenta, tipicamente, um quadro de hematúria (presença de sangue na urina) súbita e, menos freqüentemente, disúria (ardência à micção). Os locais de origem são, em ordem de freqüência, as paredes laterais da bexiga e a parede posterior (Rubin & Farber, 1990). Apresenta-se como lesão localizada e restrita à bexiga em 70% dos casos, sob forma de doença regional em 20% e como doença metastática em 10% dos casos (Srougi, 1998). Os tumores invasivos podem estender-se até o interior da parede da bexiga, porém, os estádios mais avançados invadem a próstata adjacente, as vesículas seminais, os ureteres e o retroperitônio. A disseminação hematogênica

para o fígado, pulmões e medula óssea geralmente ocorre tardiamente (Cotran *et al.*, 1991).

A extensão do carcinoma de células transicionais é descrita de acordo com a classificação de estadiamento. Segundo Jewett & Strong, em 1946 os tumores que são limitados à mucosa, sem evidências de invasão, são considerados como de estágio "0". Os tumores de estágio "A" são os que invadem a lâmina basal. A invasão da camada muscular é designada como estágio "B", sendo "B1" para invasão superficial e "B2" para invasão profunda. A invasão perivesical é considerada como estágio "C" e os tumores metastáticos são considerados como estágio "D" (Tabela 2). Mais recentemente, foi proposta uma classificação pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominada TNM, com o objetivo de tornar mais precisa a nomenclatura do estadiamento das neoplasias vesicais, facilitando a interpretação da literatura internacional. Neste sistema, também apresentado na Tabela 2, as letras T, N e M são empregadas, respectivamente, para definir a extensão clínica do tumor primário (T), o envolvimento de linfonodos (N) e a presença de metástases distantes (M) (Srougi, 1996).

O prognóstico dos carcinomas de células transicionais relaciona-se ao grau de diferenciação celular do tumor (graus I a IV) e à extensão da doença, definida pelo estadiamento. A sobrevida de cinco anos é observada em cerca de 90% dos pacientes com tumores bem diferenciados de grau I e de 25% nas lesões indiferenciadas de graus III a IV. Da mesma forma, esses índices de sobrevida são de, respectivamente, 90, 65, 25 e 10% nos tumores em estádios Ta, T1, T2 a T4 e M1 (Srougi, 1998).

O carcinoma *in situ* é responsável por cerca de 3% dos tumores epiteliais malignos da bexiga e consiste em uma lesão plana, formado por células altamente anaplásicas e malignas, com numerosas mitoses confinadas à mucosa. Alguns investigadores acreditam que este carcinoma seja precursor do câncer invasivo (Cotran *et al.*, 1991).

O carcinoma de células escamosas, caracterizado pela presença de queratinização, corresponde a cerca de 6 a 8% dos carcinomas da bexiga. Ele é



Tabela 2. Classificação de estadiamento do carcinoma de células transicionais, modificada de Srougi, 1996.

Estadiamento		Característica
Jewett & Strong	TNM*	
In situ	Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
0	Ta	Tumor restrito a mucosa
A	T1	Invasão da lâmina basal
B1	T2	Invasão muscular superficial
B2	T3	Invasão muscular profunda
C	T4	Invasão das estruturas vizinhas
D	N1-N4	Metástases para linfonodos
D	M1	Metástases à distância

*TNM=T-tumor, N-linfonodos, M-metástases

1.2. Epidemiologia do câncer da bexiga

Os tumores da bexiga constituem fortes importantes de morbidade e de mortalidade mundialmente ocupam o 11º lugar entre o tipo mais comum de câncer, correspondendo ao 4º tipo mais frequente nos homens e ao 8º nas mulheres (De-Vita et al., 1997). Segundo a WHO (1997), em 1995, foi diagnosticada mundialmente

raro nos Estados Unidos e mais freqüente no Oriente Médio, onde encontra-se epidemiologicamente relacionado com a esquistossomose (Rubin & Farber, 1990; WHO, 1997). Quanto ao estadiamento, podem ser *in situ*, porém, mais freqüentemente são tumores invasivos, vegetantes, infiltrativos e ulcerosos. O nível de diferenciação citológica é muito variável, desde lesões altamente diferenciadas, até tumores de células gigantes altamente anaplásicos (Cotran *et al.*, 1991).

Os adenocarcinomas da bexiga são raros, representando apenas 2% dos tumores da bexiga (De-Vita *et al.*, 1997). Esses tumores podem originar-se dos remanescentes do úraco, das glândulas periuretrais e periprostáticas, da cistite cística ou do epitélio metaplásico ou de transição (Cotran *et al.*, 1991). Os padrões histológicos incluem os tipos papilar, glandular, mucinoso, adenóide cístico, de célula em anel de sinete e de células claras (Rubin & Farber, 1990).

Os tumores mesenquimais podem ser benignos ou malignos e são responsáveis por cerca de 5% dos tumores da bexiga. O leiomioma é o mais comum entre os benignos, tende a crescer como uma massa oval ou esférica, isolada, encapsulada ou intramural, com tamanho variável. Entre os malignos, o rabdomiossarcoma é o mais freqüente, podendo ocorrer na forma "adulta", geralmente acima dos 40 anos de idade ou na forma "embrionária", encontrado principalmente na primeira infância. O rabdomiossarcoma da bexiga, típico da infância consiste numa massa polipóide mucosa, edematosa, como um cacho de uvas (Rubin & Farber, 1990). Todos tendem a produzir grandes massas, variando de 10 à 15 cm de diâmetro, fazendo protrusão para o interior do lume vesical. Sua aparência macroscópica é mole, carnosa e branca-acinzentada (Cotran *et al.*, 1991).

I.2. Epidemiologia do câncer da bexiga

Os tumores da bexiga constituem fontes importantes de morbidade e de mortalidade. Mundialmente ocupam o 11º lugar como o tipo mais comum de câncer, correspondendo ao 4º tipo mais freqüente nos homens e ao 9º nas mulheres (De-Vita *et al.*, 1997). Segundo a WHO (1997), em 1996, foi diagnosticado mundialmente



cerca de 310.000 casos novos, correspondendo a 3% de todos os casos de câncer. Apesar de nos últimos anos as taxas de mortalidade terem declinado em muitos países, a estimativa de mortalidade devido ao câncer da bexiga foi de 144.000 mortes, equivalente a 2% dos casos, quando consideram-se todas as mortes por câncer. Nos Estados Unidos, em 1998, esse tipo de neoplasia foi diagnosticada como a 5º mais freqüente (Hovey *et al.*, 1998), com estimativas de 54.400 casos novos e 12.500 mortes (Landis *et al.*, 1998). A estimativa da incidência do câncer da bexiga no Brasil, em 1999, foi de aproximadamente 7.550 casos novos, correspondendo a 3% quando consideram-se todos os casos de câncer e ocupando o 9º lugar entre os tipos mais comuns (INCA, 1999).

As maiores taxas de incidência ocorrem na América do Norte, Europa e Norte da África e da China, acometendo 2 a 5 vezes mais os homens do que as mulheres (WHO, 1997). Têm-se observado diferenças raciais, sendo que os indivíduos do sexo masculino e da raça branca têm taxas mais elevadas do que os negros (Rubin & Farber, 1990). A idade média de ocorrência do câncer da bexiga é 65 anos, raramente sendo diagnosticado antes dos 40 anos de idade (De-Vita *et al.*, 1997).

Alguns hábitos da vida social e alimentares também parecem estar associados com a incidência elevada do câncer da bexiga. O cigarro, por exemplo, parece ser o fator de risco mais importante, devido à excreção de seus metabólitos pela urina e atuando diretamente sobre o urotélio da bexiga. Desse modo, tem contribuído para 50% dos tumores da bexiga nos homens e 33% nas mulheres (De-Vita *et al.*, 1997). Ainda não é conhecido o mecanismo exato da ação do cigarro na mucosa da bexiga levando a transformação maligna, mas, parece que ele inibe a síntese de substâncias eicosanóides protetoras do urotélio urinário (Mikhailidis *et al.*, 1998). Conforme Augustsson *et al.* (1999), o cigarro oferece um risco relativo de 5,0% na incidência desse tipo tumoral, tem pouca relação com câncer de rim e não apresenta qualquer associação com câncer de colon e de reto.

A exposição ocupacional a certos produtos químicos orgânicos foi reconhecida, desde 1895, como carcinogênica para o urotélio da bexiga. Uma freqüência elevada de câncer da bexiga foi constatada entre operários de

indústrias de corantes na Alemanha e posteriormente nos Estados Unidos. Mais recentemente, identificou-se associação da exposição profissional à carcinógenos com risco aumentado de câncer vesical em indústrias de couro, borracha e tintas (Rubin & Farber, 1990; Srougi, 1998).

Outro fator associado ao risco elevado de desenvolvimento de câncer da bexiga é a exposição aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tais como, 2-naftil-amina, 4-aminobifenila e benzydina, assim como a exaustão de gases através da combustão. Trabalhadores expostos ao alumínio, limpadores de chaminé, operadores de veículos motorizados, mineradores e aplicadores de pesticidas, também podem apresentar um risco aumentado (De-Vita *et al.*, 1997). Assim a exposição ocupacional por carcinógenos químicos é responsável por 19% dos tumores da bexiga nos homens e 6% nas mulheres (WHO, 1997).

As aminas aromáticas encontradas na fumaça produzida pelo aquecimento do óleo de cozinha foi constatada como mutagênica em *Salmonella*. Esse composto eleva o risco de câncer da bexiga em mulheres expostas, em decorrência do tempo de exposição e de sua concentração no local de trabalho (Chiang *et al.*, 1999).

Determinados hábitos alimentares como o consumo em grande quantidade de carne frita, gorduras e peixes, independentemente do modo de cozimento foi associado com risco aumentado de câncer de colon e de bexiga (WHO, 1997; Augustsson *et al.*, 1999). Todavia, a relação entre o consumo de café e adoçantes artificiais e câncer da bexiga ainda é bastante controversa. Mesmo assim, alguns estudos mostraram que a ingestão de cinco copos ou mais de café, diariamente, parece elevar muito o risco de desenvolvimento desse tipo de câncer. Esta relação pode ser acentuada também, pelo fato do hábito de beber café estar associado à pessoas fumantes (WHO, 1997).

Na dieta alimentar, normalmente são encontrados alguns componentes nos vegetais que parecem reduzir o risco de neoplasias da bexiga. A vitamina C, por exemplo, encontrada em frutas cítricas e em algumas verduras e legumes exercem tal efeito protetor, pela capacidade de inibir a formação de nitrosaminas, potentes carcinógenos na bexiga humana, assim como, exercer um efeito



antioxidante que bloqueia os danos oxidativos ao DNA (WHO, 1997). A ingestão de grandes quantidades de líquidos, também tem-se mostrado como um hábito relacionado com baixo índice de câncer da bexiga. Indivíduos que ingerem de oito a dez copos de líquido por dia parecem ter o risco de câncer da bexiga reduzido pela metade, em relação àqueles que bebem menos de seis copos diários. Provavelmente, devido à redução da concentração dos carcinógenos presentes na urina (www.cnn.com, 1999).

A infecção parasitária por *Schistosoma haematobium* está associada com um risco aumentado para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas. Possivelmente o parasita aumenta a formação de compostos carcinogênicos N-nitrosos. Esse tipo de neoplasia é o mais comum dentre os que afetam a bexiga, em locais em que este parasita é endêmico, correspondendo a 10-29% de todos os tipos de câncer em homens na África e no Oriente Médio (De-Vita *et al.*, 1997; WHO, 1997).

1.3. Mecanismos moleculares da transformação maligna da bexiga

Os mecanismos moleculares da carcinogênese e da transformação maligna têm sido melhor entendidos a partir da investigação dos fatores iniciadores e promotores tumorais, como alterações na expressão de oncogenes e de genes supressores de tumor, envolvidos nos sinais bioquímicos inter e intracelulares e no controle da proliferação celular, em consequência de mutações de ponto e de anormalidades cromossômicas específicas, como translocações, inversões, inserções, deleções, duplicações e amplificações. Alguns genes supressores de tumor e oncogenes, como, *CDKN2*, *ARF*, *RB*, *TP53*, *BCL-2* e *ERBB-2*, assim como o fator de crescimento epidérmico (*EGF*) e seu receptor (*EGFR*) são os que estão mais freqüentemente relacionados com o início e progressão dos tumores da bexiga (De-Vita *et al.*, 1997; Kontogeorgos & Aninos, 1998).

Uma das alterações primárias da tumorigênese da bexiga é a deleção total ou parcial do cromossomo 9, provavelmente em decorrência da perda de genes supressores de tumor. A perda de heterozigossidade (LOH) no cromossomo 9



também é um evento bastante freqüente em câncer da bexiga, tendo sido observada em 70% dos tumores da bexiga avaliados por Baud *et al.* (1998), possivelmente envolvendo a presença de genes importantes nesta patologia.

Os genes supressores de tumor *CDKN2* (*INK4A*) e *CDKN2B* (*INK4B*) ligados em *tandem* na região 9p21 codificam proteínas reguladoras do ciclo celular. As proteínas p16 e p15 codificadas respectivamente, por *CDKN2* e *CDKN2B*, formam um complexo com as quinases dependentes de ciclina (cdk4 e cdk6) inibindo sua atividade e assim a fosforilação da proteína pRb durante a fase G1. Conseqüentemente, essas proteínas bloqueiam a progressão do ciclo celular na fase de transição G1-S (Hannon *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994). Esses peptídeos funcionam como inibidores específicos da família *INK4* (p16, p15, p14, p18 e p19) que promovem a parada da célula em G1 (Sherr, 1994, 1996). A proteína p19 consiste num produto secundário de *INK4A* (p19^{ARF}), devido a um molde de leitura alternativo do gene que codifica um inibidor independente.

Durante a progressão tumoral múltiplas anomalias moleculares são identificadas, atuando sinergisticamente e interferindo na regulação do controle do ciclo celular e apoptose. Os genes *RB* e *TP53* constituem dois outros genes supressores de tumor freqüentemente envolvidos na tumorigênese da bexiga.

O gene *RB1* (13q14), apresenta um transcrito de 4,7kb derivado de 27 exons. Codifica uma proteína nuclear de 110kD, a p110 ou pRb, com papel fundamental na regulação do ciclo celular (Hong *et al.*, 1989). A proteína pRB inibe a proliferação celular, reprimindo um conjunto de genes que são controlados por fatores de transcrição (E2F) com papel de transativação de genes, cujos produtos são importantes na passagem da fase G1 para S do ciclo celular (Weinberg, 1995). A pRb é mantida no estado hiperfosforilado pela ação de complexos cdk-ciclina, para a continuidade do ciclo celular e não é desfosforilada até que a célula complete a mitose e entre novamente na fase G0 ou G1 (Sherr, 1996). Mutações no gene *RB1* levando a inativação da proteína pRb podem interferir diretamente no controle do ciclo celular, assim promovendo um aumento da proliferação celular e, conseqüentemente, no processo de tumorigênese.

O gene *TP53* (17p13.1) possui cerca de 20kb (Isobe *et al.*, 1986), é constituído por 11 exons e codifica uma proteína de 53kD composta por 393 aminoácidos, com função de ativação transcricional (Donehower & Bradley, 1993; Levine *et al.*, 1994; Hansen & Oren, 1997). A proteína p53 é responsável pela parada do ciclo celular em G1 através da transativação da p21 (*WAF1/CIP1*), que inibe a atividade das quinases dependentes de ciclinas (cdks) na fase G1, mantendo o complexo pRb-E2F e, conseqüentemente, inibindo a entrada na fase S. Os complexos entre ciclinas e cdks são cataliticamente ativos. Como a proteína p21 liga-se a estes complexos (cdk4-D e cdk2-E) durante a fase G1 do ciclo celular, desativando-os, um fator importante para sua manutenção é a presença de níveis baixos de p21. Por outro lado, níveis elevados da p21 e sua ligação com os complexos cdk-ciclinas-p21, inibem sua atividade catalítica impedindo a fosforilação da pRb e, assim, bloqueando o avanço do ciclo celular (Sherr, 1994, 1996).

Estudos imunoistoquímicos têm-se mostrado eficientes para avaliação do acúmulo citoplasmático das proteínas p53 e pRb em tecido tumoral, indicando indiretamente a ocorrência de alguma mutação. Vários trabalhos têm sido desenvolvidos empregando essa metodologia. Wagner *et al.* (1995) observaram acúmulo citoplasmático da p53 em carcinoma *in situ* da bexiga, mas, raramente em biópsias com alterações menos graves, e propuseram que mutações em *TP53* podem ocorrer na transição de displasia moderada para carcinoma *in situ*. Da mesma forma, Linn *et al.* (1998), analisando pacientes jovens com menos de 30 anos, com carcinoma de células transicionais, verificaram um aumento da p53 em 67% dos casos, sendo a maioria nos estádios pTa e pT1, presumindo-se, portanto, a ocorrência de mutações em *TP53* nesses tumores. Mutações no gene *TP53* é uma alteração comum em carcinomas avançados da bexiga, exercendo uma função importante na progressão do câncer superficial da bexiga para invasivo (Sidransky *et al.*, 1991; Spruck *et al.*, 1994).

Outros estudos têm investigado a ocorrência concomitante de mutações nos genes *TP53* e *RB*, pela técnica imunoistoquímica. Em carcinomas de células transicionais da bexiga, Cordon-Cardo *et al.* (1997) verificaram padrões alterados

em 37% dos casos para o gene *TP53* e 19% para o gene *RB*. Nenhum tumor apresentou alteração concomitante para ambos os genes, mas, esses genes quando mutados estavam relacionados com a progressão tumoral e menor sobrevida do paciente. Acredita-se que os padrões alterados dos genes *TP53* e *RB* desregulam o ciclo celular na fase G1 e reduzem a resposta celular à morte celular programada, nos casos em que ocorrem lesões no DNA (Cordon-Cardo *et al.*, 1997). Cote *et al.* (1998) constataram que em carcinomas de células transicionais com expressão alterada tanto da pRb como da p53, o prognóstico dos pacientes era ruim, sugerindo efeitos cooperativos entre os dois genes. Esses autores também observaram que a expressão elevada da proteína pRb, assim como, a ausência de sua expressão estava relacionada com baixa taxa de sobrevida e elevado índice de recorrência. Os tumores com expressão intermediária apresentavam um prognóstico melhor.

O gene *P73* (1p36.3), membro da família *TP53*, é um candidato a supressor tumoral. Parece expressar-se monoalelicamente em tecido normal induzindo apoptose ou parada do ciclo celular em G1. Para identificar seu possível envolvimento com a tumorigênese urotelial, Chi *et al.* (1999) avaliaram a sua expressão e a ocorrência de mutações no RNAm em 45 carcinomas primários da bexiga. A análise quantitativa por PCR não demonstrou perda alélica do gene, mas constatou expressão elevada em 40% dos casos analisados, sendo correlacionada com o grau e o estágio tumoral. Os carcinomas heterozigotos para o gene tinham expressão bialélica (52%), enquanto que nos tecidos normais a expressão era sempre monoalélica. Dos tumores com expressão bialélica, 66,7% mostraram níveis elevados de RNAm do gene *P73*, enquanto apenas 18,2% dos tumores monoalélicos apresentaram expressão elevada, sugerindo que o aumento da expressão da p73 pode ser causado pela ativação transcricional de um alelo silencioso em carcinomas. Os dados sugerem que o *P73* não desempenha um papel de supressão tumoral na carcinogênese da bexiga, mas que a ativação de um alelo silencioso pode contribuir para a progressão desses tumores.

Outra anomalia freqüente no desenvolvimento dos tumores da bexiga é a expressão elevada e amplificação do fator de crescimento epidérmico (EGF). O



EGF é um polipeptídeo de baixo peso molecular presente em concentração elevada na urina humana. Em estudos de linhagens celulares de tumores da bexiga, o EGF é capaz de induzir a proliferação celular ativando a síntese de DNA, RNA e proteínas (De-Vita *et al.*, 1997; Kontogeorgos & Aninos, 1998).

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) constitui uma glicoproteína localizada na membrana plasmática com um receptor externo para o EGF, que quando ligado ao receptor ativa uma seqüência de fosforilação de treonina e tirosina que regulam o crescimento celular (Kontogeorgos & Aninos, 1998). O gene responsável pelo EGF-R, o *ERBB* está mapeado na região cromossômica 7p12, assim hiperploidias do cromossomo 7 podem estar relacionadas com a expressão elevada desse receptor, levando a uma divisão celular descontrolada e à carcinogênese (Waldman *et al.*, 1991). Análises imunoistoquímicas evidenciaram um acúmulo do EGF-R em 87,5% dos carcinomas de células transicionais, relacionando a expressão aumentada com tumores de grau e estágio avançados, progressão tumoral e prognóstico pobre (Knudson *et al.*, 1985).

Outro fator de crescimento envolvido com câncer da bexiga, câncer de cabeça e pescoço, duodeno e renal é o fator de crescimento tumoral (TGF- α), cujo gene foi mapeado em 2p11-p13 (Brissenden *et al.*, 1985). Ele constitui um produto de clivagem que está estruturalmente relacionado com o EGF e compete com ele pela ligação com o receptor EGF-R, de modo que deve também estar associado com a progressão de diversas neoplasias. Pela técnica RT-PCR utilizada em carcinomas de células transicionais da bexiga, Gazzaniga *et al.* (1998) mostraram que a expressão de níveis aumentados de TGF- α ocorria apenas em tumores mais avançados e com taxa de recorrência elevada.

Uma nova classe de oncogenes, incluindo o *BCL-2* parece atuar no processo tumorigênico inibindo a morte celular programada ou apoptose (Williams, 1991). Esse oncogene foi inicialmente descoberto devido a t(14;18) (q32; q21) em linfoma folicular humano e constitui um membro dos reguladores da apoptose (Tsujimoto *et al.*, 1985). Ele codifica uma proteína localizada principalmente na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e envoltório

nuclear (Hockenbery *et al.*, 1991), que bloqueia a apoptose induzida por diversos estímulos, sem afetar a proliferação celular. A expressão elevada da proteína bcl-2 parece alterar a sensibilidade tumoral à quimio-radioterapia (Lotem & Sachs, 1993). O aumento da expressão de bcl-2 em alguns tipos de tumores (linfoma, leucemia, neuroblastoma e próstata) está associado a um prognóstico pior (Lu *et al.*, 1996). Kong *et al.* (1998) avaliaram a expressão das proteínas bcl-2 e p53 em carcinomas de células transicionais da bexiga, por análise imunoistoquímica. De modo geral, os pacientes cujos tumores foram positivos para ambas proteínas tinham sobrevida menor e resposta mais pobre a imunoterapia, provavelmente, devido a uma resistência a quimio e radioterapia. Esses resultados também estavam relacionados com os tumores de estádios e graus avançados, recorrência e progressão tumoral. Hipoteticamente, a proteína bcl-2 pode contribuir para a resistência do câncer epitelial ao tratamento clínico. Nakopoulou *et al.* (1998), também observaram uma tendência de aumento da expressão de bcl-2 em carcinoma de células transicionais superficiais de baixo grau e perda da expressão da proteína em tumores de grau elevado, principalmente, nos casos invasivos. Provavelmente a bcl-2 prolonga a sobrevivência celular inibindo a apoptose. Conseqüentemente, promove o crescimento neoplásico em uma taxa menor quanto à induzida pela ação de outros oncogenes, que atuam estimulando a proliferação celular (Pezzela *et al.*, 1993).

Alguns oncogenes como o *K-RAS* (12p13), o *H-RAS* (11p15.1), o *C-MYC* (8q24) e o *SRC* (1p36.1-p36.2) apresentam atividades alteradas em alguns tipos de tumores da bexiga. As mutações nos códons 12, 13 e 61 do gene *H-RAS* são observadas em cerca de 10% dos tumores da bexiga, assim como a expressão elevada da proteína p21^{RAS}, produto do oncogene *RAS* (Kontogeorgos & Aninos, 1998). A primeira mutação em oncogenes da família *RAS*, foi identificada no códon 12 do gene *H-RAS* em uma linhagem celular de câncer da bexiga (Reddy *et al.*, 1982), consistindo uma das alterações predominantes que afeta esta família. Czerniak *et al.* (1990, 1992) observaram uma freqüência de aproximadamente 40% dos tumores da bexiga com mutações no códon 12 desse oncogene.

A expressão do oncogene *c-ERBB-2* (*HER-2/neu*) também tem sido investigada em câncer da bexiga. Ele está localizado na região cromossômica 17q21, codifica informações para a síntese de um receptor fosfoglicoprotéico transmembrânico, a proteína p185, estruturalmente semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF-R) (Semba *et al.*, 1985). Estudos imunocitoquímicos e por *Western blot* mostraram que a proteína p185, era mais freqüentemente encontrada em tumores de grau e estágio avançados, assim como em metástases nodais. Portanto, o produto do gene *c-ERBB-2* pode ser usado como um marcador tumoral para avaliar o potencial maligno dos tumores da bexiga (Tarbin *et al.*, 1982; Moryama *et al.*, 1991). O produto desse gene também foi detectado por imunoistoquímica em 60% dos carcinomas *in situ* avaliados por Wagner *et al.* (1995). Os autores observaram padrões diferentes de expressão das proteínas p185 e p53 também em urotélio normal e pré-canceroso, mostrando que a expressão aumentada dessas proteínas não está limitada aos tumores invasivos e sugerindo que tenham implicações com a transformação maligna do urotélio da bexiga.

O ciclo celular é regulado por diferentes genes que atuam em múltiplas etapas para garantir o controle do crescimento celular. Em câncer da bexiga, como descrito, alguns desses genes quando alterados parecem interferir na proliferação celular atuando no início ou na progressão tumoral. Os principais genes supressores de tumor envolvidos com a tumorigênese urotelial, como o *TP53*, o *RB1*, o *CDKN2* (*INK4A*) e o *ARF* participam em duas vias no controle do ciclo celular (Figura 1), segundo Markl & Jones (1998). Utilizando linhagens celulares de câncer da bexiga, esses autores propuseram um modelo de regulação do ciclo celular envolvendo os genes *CDKN2A* e *RB* e uma segunda via, envolvendo os genes *ARF*, *TP53*, *MDM2* e *CDKN1A*. Na primeira via o *CDKN2* (*p21*, *WAF1/CIP1*) inibe a atividade do complexo cdk3-ciclina impedindo a fosforilação da proteína pRb. Essa proteína quando desfosforilada liga-se ao fator de transcrição E2F e impede a transcrição de genes responsáveis pela passagem da célula para a fase S do ciclo celular, ficando as mesmas bloqueadas na fase G1. Quando a pRb é fosforilada, ela libera o fator de transcrição E2F, que

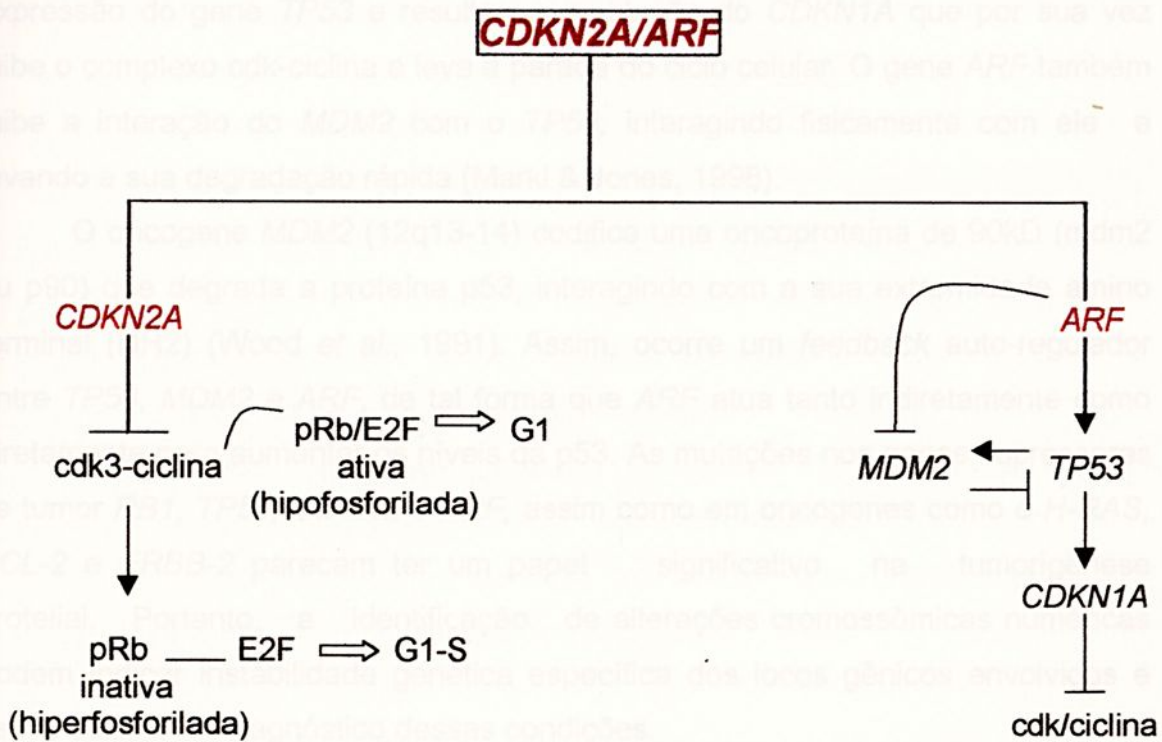


Figura 1. Esquema das vias de tumorigênese urotelial, em linhagens celulares com o envolvimento dos principais oncogenes e supressores de tumor (modificada de Markl & Jones, 1998). $\rightarrow$:ativação; —| :desativação.

ativa a transcrição de genes envolvidos na progressão da divisão celular, com passagem da fase G1 para S. A segunda via que envolve o gene *ARF*, induz a expressão do gene *TP53* e resulta na regulação do *CDKN1A* que por sua vez inibe o complexo cdk-ciclina e leva a parada do ciclo celular. O gene *ARF* também inibe a interação do *MDM2* com o *TP53*, interagindo fisicamente com ele e levando a sua degradação rápida (Markl & Jones, 1998).

O oncogene *MDM2* (12q13-14) codifica uma oncoproteína de 90kD (mdm2 ou p90) que degrada a proteína p53, interagindo com a sua extremidade amino terminal (NH2) (Wood *et al.*, 1991). Assim, ocorre um *feedback* auto-regulador entre *TP53*, *MDM2* e *ARF*, de tal forma que *ARF* atua tanto indiretamente como diretamente para aumentar os níveis da p53. As mutações nos genes supressores de tumor *RB1*, *TP53*, *CDKN2* e *ARF*, assim como em oncogenes como o *H-RAS*, *BCL-2* e *ERBB-2* parecem ter um papel significativo na tumorigênese urotelial. Portanto, a identificação de alterações cromossômicas numéricas podem indicar instabilidade genética específica dos locos gênicos envolvidos e assim auxiliar no diagnóstico dessas condições.

I.4. Alterações citogenéticas em câncer da bexiga

O prognóstico dos tumores da bexiga depende do tipo, do grau histológico e principalmente, do estágio clínico na época do diagnóstico. De modo geral, os carcinomas de células transicionais têm melhor prognóstico do que os de células escamosas. Os tumores que têm maior probabilidade de comportar-se como malignos, com características de invasão, metastização e recidivas, têm demonstrado ausência de antígenos de grupos sanguíneos nas suas superfícies celulares, alterações nos complexos juncionais ao exame por microscopia eletrônica, cariótipos anormais, amplificações ou mutações em oncogenes e poliploidia ou aneuploidia em análise de fluxocitometria (Cotran *et al.*, 1991).

Devido a grande variedade de tipos histológicos dos tumores da bexiga torna-se evidente a necessidade de técnicas mais eficientes de investigação de

marcadores cromossômicos, principalmente em pacientes com alto risco de progressão e metastização (Campbell *et al.*, 1998).

As investigações citogenéticas de tumores sólidos, apesar dos avanços nas últimas décadas, ainda são limitadas quando comparadas às alterações já estabelecidas em certos tumores hematológicos, necessitando portanto, maiores investigações tanto na área citogenética como molecular, com o objetivo de identificar genes envolvidos no processo neoplásico. O trabalho conjunto e simultâneo dessas duas áreas tem oferecido substancial contribuição para o mapeamento de genes relacionados com os processos de iniciação e progressão tumoral. Assim sendo, têm sido propostos métodos alternativos, para o esclarecimento de alterações genéticas em tumores.

A citogenética molecular, através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), tem fornecido dados mais precisos sobre as modificações genéticas que ocorrem em células tumorais, assim, assumindo grande importância nas pesquisas em câncer (Varella-Garcia & Mc Gavran, 1995).

A técnica de hibridação *in situ*, baseada na complementariedade de seqüências de ácidos nucleicos, foi inicialmente descrita por Pardue e Gall em 1969, os quais utilizaram sondas marcadas com rádio-isótopos e detectadas por autorradiografia. Posteriormente, desenvolveram-se métodos utilizando sondas modificadas quimicamente, as quais podem ser detectadas pela atividade enzimática ou por fluorescência, o que promoveu a expansão da aplicação da técnica de hibridação *in situ* (Viegas-Pequignot *et al.*, 1989). Essa técnica permite a visualização citológica de seqüências específicas de DNA ou RNA, sendo aplicada no mapeamento de genes, na detecção de aneuploidias, amplificação gênica e rearranjos cromossômicos equilibrados ou não. A técnica FISH supera aquela por rádio-isótopo por apresentar alta sensibilidade e especificidade, maior estabilidade da sonda e por permitir um resultado mais rápido e o mapeamento direto sem análise estatística.

A técnica FISH pode ser aplicada em cromossomos metafásicos ou em núcleos interfásicos (citogenética interfásica) obtidos de cultura celular, desagregação celular de tecido fresco, material de arquivo emblocado em



parafina, aspirado celular, células de descamação da urina e lavado vesical, podendo ser utilizada nos estudos de doenças hematopoéticas e tumores sólidos. Nas investigações de células neoplásicas, essa técnica vem sendo largamente utilizada para diagnóstico de aberrações cromossômicas numéricas como aneuploidias e hiperploidias, de alterações estruturais como translocações, para identificação de cromossomos marcadores, cromossomos em anel, entre outras. Portanto, a citogenética e a genética molecular desempenham um papel fundamental na elucidação das aberrações existentes em um determinado tipo tumoral, levando à um refinamento no diagnóstico, o que pode direcionar um novo tratamento para o paciente, futuramente até em nível gênico (Choong *et al.*, 1997).

A caracterização dos tumores da bexiga pela citogenética clássica tem revelado algumas anomalias cromossômicas heterogêneas e não-padronizadas. Entretanto, alguns cromossomos estão mais freqüentemente envolvidos. No cromossomo 1 foram detectados rearranjos afetando tanto o braço curto como o longo, enquanto no cromossomo 3, alguns rearranjos afetam somente o braço curto. A trissomia do cromossomo 7, a monossomia do 9 e as deleções da região 10q também são eventos bastante freqüentes. A alteração mais comum em aproximadamente metade dos tumores da bexiga é a deleção dos braços longo e curto ou a monossomia do cromossomo 9. Parece que a trissomia 7 é uma das primeiras alterações que ocorre na tumorigênese urotelial, enquanto que as alterações dos cromossomos 1, 5, 8 e 11 aparecem nos casos mais tardios (Heim & Mitelman, 1995; Kontogeorgos & Aninos, 1998).

Outras anomalias cromossômicas freqüentes em tumores da bexiga são as deleções do cromossomo 13 e das regiões 17p e 18q em tumores no estágio inicial, além de deleções 11p e 3p tanto em tumores superficiais como invasivos (De-Vita *et al.*, 1997). A região 3p foi melhor detalhada pelas técnicas de Hibridação Genômica Comparativa (HGC) e FISH evidenciando-se o envolvimento da região 3p13-p14.2 (Vieten *et al.*, 1998).

As alterações citogenéticas que envolvem os cromossomos 2, 3, 5, 7, 8 e 12 ocorrem mais especificamente em sarcomas da bexiga, como condrossarcomas, que são histologicamente confundidos com os carcinomas de



células transicionais e carcinomas de células escamosas, podendo assim, auxiliar o diagnóstico diferencial entre os tumores (Kingsley *et al.*, 1997).

No Egito, onde o *Schistosoma haematobium* é endêmico, Aly *et al.* (1999), observaram pela técnica FISH, que as perdas dos cromossomos 9 e 17 e o ganho do cromossomo 7 eram as alterações numéricas mais frequentes em carcinomas de células escamosas.

Resultados semelhantes foram descritos por Ghaleb *et al.* (1996) e Pycha *et al.* (1998). Pycha *et al.* (1998) observaram trissomia ou polissomia 7 em 79% dos pacientes com tumores avançados, monossomia 9 em 92% dos casos e uma taxa menor dos casos com alteração do cromossomo 17 (29%).

Em carcinoma de células escamosas secundário, originado de carcinoma de células transicionais, foram observadas aberrações cromossômicas características do tipo histológico original, tais como monossomia 9, trissomia 7 e rearranjos dos cromossomos 3, 8, 10, 13 e 17, dificultando portanto, a diferenciação desses dois tipos de tumores (Fadl-Elmula *et al.*, 1998 a).

Os carcinomas de células transicionais (CCT) também são caracterizados citogeneticamente pela ocorrência de determinadas anomalias numéricas. Hopman *et al.* (1991) avaliando 40 casos de CCT, observaram monossomia 9 e trissomias 1, 7 e 11 como os eventos mais frequentes. A partir de estudo com a técnica FISH em 12 carcinomas de células transicionais invasivos e não-invasivos, Wang *et al.* (1994) detectaram diversas aberrações numéricas afetando o cromossomo 10, como monossomia, trissomia e tetrassomia e sugeriram que a perda parcial ou total deste cromossomo pode ser uma anomalia não casual na carcinogênese da bexiga.

Em um caso de carcinoma de células transicionais induzido após radioterapia da região pélvica, as regiões mais afetadas foram as bandas 9q22, 1q25, 7q22, 8q11 e 20q11 sugerindo que carcinoma da bexiga após irradiação parece ser citogeneticamente distinto dos demais tumores primários (Fadl-Elmula *et al.*, 1998 b).

Determinados estudos têm mostrado uma relação entre anomalias cromossômicas específicas e estágio tumoral em CCT. As anomalias numéricas

dos cromossomos 7, 9 e 17 foram observadas em vários estádios do desenvolvimento tumoral de CCT. A técnica HGC tem evidenciado alguns marcadores tumorais característicos para cada um desses estádios de desenvolvimento. A deleção 9q tem sido observada como uma alteração inicial, no estágio não-invasivo pTa (Bruch *et al.*, 1998), assim como as perdas 9p e Y e os ganhos em 1q e 17 (Richter *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1998). Essas alterações podem desempenhar um papel importante na caracterização dos carcinomas papilares não-invasivos. Nos carcinomas em estágio invasivo limitado a lâmina própria (pT1), as perdas em 2q, 8p, 9p, 9q, 11p e 11q e os ganhos em 1q, 8q, 3p, 3q, 5p, 6p, 10p e 17 são os eventos mais comuns. A média total de aberrações observadas em pT1 foi mais alta do que em pTa, sugerindo um aumento da instabilidade genômica nesse estágio. As regiões indicadas podem conter genes envolvidos com o crescimento tumoral invasivo em câncer da bexiga e estão relacionados com a invasão em câncer superficial da bexiga (Richter *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1998). No estágio invasivo mais adiantado (pT2), os ganhos em 5p e 20q são as alterações mais freqüentes (Bartlett *et al.*, 1998; Bruch *et al.*, 1998). Esses dados sugerem uma relação entre determinadas regiões cromossômicas e a progressão tumoral. Yokogi *et al.* (1996) observaram uma forte associação entre aneussomia do cromossomo 17 e o estágio e grau do tumor, contudo, aneussomias dos cromossomos 7 e 9 foram correlacionadas apenas ao estágio tumoral.

Ainda em carcinomas de células transicionais em estágio pT2, Hovey *et al.* (1998) pela técnica HGC encontraram alterações que incluíam ganhos 6p, 8q, 10q e 17q em 40% dos tumores e perdas 8p, 10q e Y, tanto nos tumores primários como nas metástases, com elevada concordância entre os achados no tumor primário e metástases dos mesmos pacientes. Nesses tumores, destacaram-se duas regiões com alto nível de amplificação, ou seja, 10q22.1-q23.1 e 17q11-q21.3, no loco do gene *c-ERBB-2*.

A freqüência elevada de alterações do cromossomo 9 em carcinoma de células transicionais, obtida pela técnica FISH, levantou algumas dúvidas sobre a classificação dos estádios pTa e pT1. Embora os carcinomas pT1 sejam

freqüentemente agrupados juntos com pTa, como carcinomas superficiais da bexiga não-invasivos, o estágio pT1 tem revelado uma freqüência bastante elevada de alterações no cromossomo 9 (85%) em relação ao estágio pTa (47%), sugerindo que os tumores no estágio pT1 podem não estar localizados tão superficialmente na bexiga como o estágio pTa (Sauter et al., 1997). Interessantemente, Richter et al. (1998) observaram alterações genéticas semelhantes em carcinomas nos estádios pT1 e pT2, sugerindo que os carcinomas da bexiga com maior potencial invasivo representam um subtipo distinto dos tumores pTa, que apresentam poucas alterações genéticas.

Mais recentemente, Neuhaus et al. (1999) utilizando a técnica FISH em 105 casos de tumores superficiais da bexiga em estádios pTa e pT1 detectaram alterações nos cromossomos Y, 1, e 17. A polissomia do cromossomo 1 foi encontrada em 46% dos casos e a do cromossomo 17, em 40% dos tumores. Os cromossomos 1 e 17 mostraram polissomia, com maior freqüência, nos tumores em estágio pT1. Quanto ao cromossomo Y não foram observadas perdas com freqüências significantes.

As aberrações cromossômicas em células neoplásicas fornecem informações essenciais para o mapeamento de mutações que predispõem ou que levam ao câncer. A associação de uma alteração cariotípica ou de um número limitado delas com um tipo específico de tumor pode indicar a presença, no local do rearranjo, de um ou mais genes importantes para o processo neoplásico, tanto de formas herdadas como esporádicas (Goddard & Solomon 1993).

II. Objetivos

II. Objetivos

Tendo em vista a importância de indicar possíveis marcadores cromossômicos que possam auxiliar no diagnóstico precoce dos tumores da bexiga, propôs-se o presente trabalho com os seguintes objetivos:

- a. investigar a ocorrência de anomalias numéricas envolvendo os cromossomos 7, 9 e 17 em núcleos interfásicos de lesões da bexiga, pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente;
- b. comparar os resultados com os obtidos em núcleos interfásicos de tecido macroscopicamente normal da bexiga, em células de descamação da bexiga e em linfócitos de indivíduos saudáveis.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III. Material e Métodos

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/93 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBILGE-UNESP de São José do Rio Preto e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CN (Parecer nº 408/99).

III.1. Caracterização das amostras

Foram obtidas dezessete amostras de tecidos frescos obtidas após ressecção cirúrgica, sendo quatorze provenientes de carcinomas da bexiga (BXT), duas cistites (BXC) e três amostras de tecido macroscopicamente normal da bexiga (BKN) provenientes de vias dos pacientes, numa área distante da margem de segurança do tumor. Desses grupos, onze indivíduos eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino, com idades entre 52 a 83 anos ($\bar{x}=68,3$, $s=8,5$). As amostras foram coletadas pelos médicos José Carlos Mesquita, no Hospital de Base de São José do Rio Preto, Eliseu Denadai, na Beneficência Portuguesa e Antonio Barbosa de Oliveira, no Hospital Nossa Senhora da Paz, ambos de São José do Rio Preto, SP. Todas as amostras foram obtidas anteriormente ao tratamento radio e quimioterápico.

O diagnóstico histopatológico foi realizado pelos laboratórios de patologia do Hospital de Base, utilizando a técnica Hematoxilina-eosina e histológico KOFF, Instituto de Anatomia Patológica Citopatológica (IAPC), utilizando a técnica RTU e o histológico da OMS e o histológico MOSTORI e estadiamento JEWETT. Todos os laboratórios de São José do Rio Preto-SP.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Na Tabela 3 estão apresentados os dados referentes ao diagnóstico histopatológico, idade, sexo, tabagismo e atividade profissional dos indivíduos. Das amostras estudadas, treze consistiram em carcinomas de células transitórias (CCT) com graus variáveis de I a IV, um carcinoma anaplásico

III. Material e Métodos

De acordo com as Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, o projeto referente ao presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - DF (Parecer nº 409/99).

III.1. Caracterização das amostras

Foram obtidas dezenove amostras de tecidos frescos obtidas após ressecção cirúrgica, sendo quatorze provenientes de carcinomas da bexiga (BXT), duas cistites (BXC) e três amostras de tecido macroscopicamente normal da bexiga (BXN) provenientes de três dos pacientes, numa área distante da margem de segurança do tumor. Desses grupos, onze indivíduos eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino, com idades entre 52 a 83 anos ($\bar{x}=68,3$; $s=8,5$). As amostras foram coletadas pelos médicos José Carlos Mesquita, no Hospital de Base de São José do Rio Preto, Eliseu Denadai, na Beneficência Portuguesa e Antonio Barbosa de Oliveira, no Hospital Nossa Senhora da Paz, ambos de São José do Rio Preto, SP. Todas as amostras foram obtidas anteriormente ao tratamento rádio e quimioterápico.

O diagnóstico histopatológico foi realizado pelos laboratórios de patologia do Hospital de Base, utilizando a técnica Hematoxilina-eosina e histológico KOFF, Instituto de Anatomia Patológica Citopatológica (IAPC), utilizando a técnica RTU e o histológico da OMS e LarPAC, utilizando as técnicas de Hematoxilina-eosina, histológico MOSTOFI e estadiamento JEWETT. Todos os laboratórios de São José do Rio Preto-SP.

Na Tabela 3 estão apresentados os dados referentes ao diagnóstico histopatológico, idade, sexo, tabagismo e atividade profissional dos indivíduos. Das amostras estudadas, treze consistiram em carcinomas de células transicionais (CCT) com graus variáveis de I a IV, um carcinoma anaplásico



Tabela 3. Caracterização das amostras quanto ao tipo de tecido, idade, sexo, tabagismo e profissão dos indivíduos.

Código	Diagnóstico histopatológico (graduação)	Idade (anos)	Sexo	Tabagismo (anos)	Profissão
Carcinomas :					
BXT01	CCT (I)	82	M	Não	Alfaiate
BXT02	CCT (I)	64	M	Sim (20)	Lavrador
BXT03	CCT (I)	62	M	Sim (50)	Pintor
BXT04	CCT (I)/ Urotélio normal	65	M	Ex-fumante (22)	Motorista
BXT05	CCT (I)	83	M	Ex-fumante	Dentista
BXT06	CCT (II)	77	F	*	Pensionista
BXT07	CCT (II)/ Urotélio normal	52	F	Sim (42)	Do lar
BXT08	CCT (II)	69	F	Não	Do lar
BXT09	CCT (II)	69	M	Sim (60)	Guarda
BXT10	CCT (II)	*	F	*	*
BXT11	CCT (III)	67	M	Sim (30)	Motorista
BXT12	CCT(IV)	75	M	Sim (20)	Aposentado
BXT13	CCT (IV)/ Urotélio normal	62	M	Sim (50)	Aposentado
BXT14	CAI	*	M	*	*
Benignos:					
BXC01	CCI	68	M	Sim (30)	Lavrador
BXC02	CCI	62	F	Não	Do lar

CCT= carcinoma de células transicionais; CAI= carcinoma anaplásico indiferenciado; CCI= cistite crônica inespecífica; M= masculino; F= feminino; *dados não disponíveis.

indiferenciado (CAI) e duas células cúbicas inespecíficas (CCI), com história de CCT anterior.

Como controle (Tabela 4) foram utilizadas cinco amostras de células de descamação da bexiga (BXD) obtidas na primeira urina de manhã de indivíduos jovens, saudáveis, com idade entre 15 e 27 anos ($\bar{x}$ = 21,8, s = 4,4), não fumantes, nem vitais, sem história de câncer e que não estavam sendo tratados com medicação.

Tabela 4. Caracterização do grupo controle referente aos linfócitos cultivados e células de descamação da bexiga, e dados quanto a idade, sexo e profissão dos indivíduos.

Células normais	Código	Idade (anos)	Sexo	Profissão
Linfócitos:	LFT01	35	M	Médico
	LFT02	31	M	Escriturário
	LFT03	28	F	Do lar
	LFT04	81	M	Aposentado
	LFT05	34	M	*
Descamação da bexiga:	BXD01	21	M	Estudante
	BXD02	24	F	Estudante
	BXD03	15	F	Estudante
	BXD04	27	M	Escrevente
	BXD05	22	M	Estudante

M=masculino; F=feminino; *dado não disponível

indiferenciado (CAI) e duas cistites crônicas inespecíficas (CCI), com história de CCT anterior.

Como controle (Tabela 4) foram utilizadas cinco amostras de células de descamação da bexiga (BXD) obtidas na primeira urina da manhã de indivíduos jovens, saudáveis, com idades entre 15 e 27 anos ($\bar{x}$ = 21,8; s = 4,4), não-fumantes, nem etilistas, sem história de câncer e que não estavam sendo submetidos à terapias e raios X. Foram utilizadas também cinco amostras de linfócitos de sangue venoso periférico (LFT), de indivíduos adultos e saudáveis, com constituição cromossômica normal e idades entre de 28 a 81 anos ($\bar{x}$ = 41,8; s = 22,0).

III.2. Metodologia para estudo citogenético

III.2.1. Cultura de linfócitos

Os linfócitos foram obtidos a partir de punção de sangue venoso periférico em seringa heparinizada com liquémine (Roche). As culturas foram desenvolvidas segundo técnica padrão utilizada pelo Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, UNESP de São José do Rio Preto, SP (Varella-Garcia & Tajara, 1991), utilizando-se o meio RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, antibióticos e fito-hemaglutinina (Gibco).

III.2.2. Método para obtenção de núcleos interfásicos a partir de tecido fresco

Após a ressecção cirúrgica as amostras de carcinomas, cistites e tecido normal da bexiga foram acondicionadas em tubos de centrífuga estéreis e descartáveis, previamente identificados com os dados dos pacientes, contendo solução salina de Hanks acrescida de penicilina (100 U/mL) e quemicetina (500mg/mL), os quais foram mantidos sob refrigeração a 4°C, até o momento do processamento.



O tecido inicialmente foi submetido à desagregação mecânica em placa de Petri, com auxílio de tesoura e bisturi em câmara de fluxo laminar. Ao material desagregado foi adicionado 2 mL de solução hipotônica KCl 0,075M pré-aquecida a 37°C em banho-Maria e incubado a 37°C em estufa, por 30 minutos. Essa solução foi aspirada com auxílio de pipeta Pasteur e foi adicionado 2 mL de fixador (3 metanol:1 ácido acético) para lavagem do material, sendo aspirado em seguida com pipeta Pasteur e a operação repetida por mais duas vezes. Novamente foi adicionado 2 mL de fixador e o material estocado a -20°C durante à noite.

Após esse período, o fixador foi totalmente aspirado e o material seco à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. Logo após, foi adicionado 2 mL de ácido acético 60% onde permaneceu de 4 a 16 horas. Finalmente, o material foi ressuspendido várias vezes e gotejado em lâminas umedecidas e geladas, sobre placa aquecedora a 50°C.

III.2.3. Método para obtenção de células de descamação da bexiga

As células de descamação da bexiga foram obtidas a partir de coleta da primeira urina da manhã em tubos de centrifuga estéreis de 50 mL.

O material foi centrifugado por 20 minutos a 1200 rpm e o sobrenadante descartado. Em seguida foi adicionado solução hipotônica KCL 0,075M pré-aquecida a 37°C e mantida por 30 minutos em banho-Maria a 37°C. O material foi centrifugado novamente da mesma forma e, em seguida, adicionou-se ácido acético 60%. Após centrifugação a 1200 rpm por 20 minutos o sobrenadante foi descartado e esta etapa foi repetida por três vezes para lavagem do material. Finalmente o material foi gotejado em lâminas secas a 50°C em placa aquecedora e mantidas a -70°C até o momento da hibridação.



III.2.4. Hibridação *in situ* fluorescente - FISH

Foi empregada a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), em núcleos interfásicos, com a utilização de sondas alfa-centroméricas dos cromossomos 7 e 17 (Oncor) e satélite clássica do cromossomo 9 (cedida pela Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia, Cancer Center, University of Colorado Health Sciences Center, USA). As sondas 7 e 17 foram marcadas com biotina e detectadas com anticorpos Vector Avidina D (marcado com fluorocromo FITC) e Anti-Avidina-D biotinilado. A sonda do cromossomo 9 era de marcação direta com o fluorocromo Spectrum Red.

a) Pré-tratamento para amostras de material fresco

As áreas desejadas para hibridação, contendo maior densidade de núcleos de melhor qualidade, foram assinaladas sob as lâminas com uso de lápis diamante.

As lâminas com menos de três dias foram envelhecidas em 2xSSC (50mL de 20xSSC ; 450mL de água milli Q) pH 7,0 a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foram desidratadas numa série crescente de etanol (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada à temperatura ambiente e após secas naturalmente.

As lâminas envelhecidas naturalmente com mais de três dias foram submetidas diretamente à desidratação em etanol (70, 85 e 100%) por 2 minutos cada à temperatura ambiente, seguida de secagem ao ar.

Logo após, foram tratadas com ácido acético 70% à temperatura ambiente por 1 minuto. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em três banhos de 1xPBS por 3 minutos cada e submetidas a nova desidratação em etanol (70, 85 e 100%), por 2 minutos cada e totalmente secas ao ar.

Posteriormente, estas lâminas foram tratadas com pepsina 0,008% em HCl 0,001M (42µL HCl; 5µL de 10x pepsina; 50mL de água milli-Q) de 1 a 5 minutos em banho-Maria a 37°C. Logo após, iniciou-se a fixação em formaldeído 4% em 1xPBS a 37°C por 5 minutos. Foram novamente lavadas em três banhos

de 1xPBS à temperatura ambiente por 5 minutos cada e, em seguida, foram desidratadas em etanol (70, 85 e 100%) e secas ao ar.

b) Hibridação

Sobre as lâminas pré-tratadas adicionou-se 10 μ L da solução de sonda diluída em Hibrisol IV, para os cromossomos 7 e 17 e Hibrisol mix (formamida 50% e 2xSSC) para o cromossomo 9, que foram, então, cobertas com lamínulas de vidro, imediatamente vedadas com selante e incubadas em estufa a 84°C por 8 minutos para desnaturação do DNA alvo e da sonda (codenaturação). Logo após, foram transferidas para uma câmara umedecida com água, em estufa a 37°C, por um período que variou entre 16 e 48 horas.

Após o período de incubação, o selante foi retirado e as lâminas foram mergulhadas em 2xSSC para retirada das lamínulas. Em seguida, foram lavadas para remoção do excesso de sonda, em um a três banhos consecutivos de formamida 50% a 37°C, por 2 a 5 minutos cada e, em um a três banhos de 2xSSC a 37°C, por 2 a 5 minutos cada.

c) Detecção para sondas de marcação indireta

Após o processo de lavagem, as lâminas hibridadas com as sondas dos cromossomos 7 e 17, de marcação indireta foram lavadas em três banhos consecutivos em uma solução pré-incubação 1xPBD, por 2 minutos cada à temperatura ambiente.

Em seguida, iniciou-se o processo de detecção com os anticorpos I e II, ou seja, a avidina fluoresceína e a anti-avidina D biotinilada, respectivamente. As lâminas receberam 50 μ L do anticorpo I (1 μ L anti I; 1000 μ L de solução de bloqueio II), foram recobertas com lamínulas de plástico e incubadas a 37°C durante 30 minutos, no escuro. Após esse período, foram lavadas em três banhos de 1xPBD durante 2 minutos cada. Posteriormente, receberam 50 μ L do anticorpo II (1 μ L anti II; 200 μ L de solução de bloqueio II) e foram, novamente, incubadas a 37°C durante 30 minutos, no escuro. Foram novamente lavadas em três banhos de 1xPBD e então, adicionou-se 50 μ L do anticorpo I durante 30 minutos a 37°C,

também no escuro. Foram submetidas a uma nova lavagem em 1xPBD e contracoradas com adição de 10 μ L de solução corante (1 μ L PPD; 2,5 μ L de PI; 2,0 μ L DAPI) por área de hibridação e cobertas com lamínulas de vidro.

d) Contra-coloração para sonda de marcação direta

As lâminas hibridadas com a sonda do cromossomo 9, marcada diretamente com o fluorocromo Spectrum Red, não precisavam passar pela fase de detecção. Logo após o processo de lavagem pós-hibridação essas lâminas foram desidratadas em etanol (70, 85 e 100%) no escuro e receberam 12 μ L do contracolorante DAPI, sendo então, cobertas com lamínulas de vidro.

III.3. Análise ao microscópio

A observação foi realizada por dois pesquisadores independentes que contaram cerca de 150 núcleos para cada sonda, em microscópio Caarl Zeiss Axioskop com lâmpada HBO 50W, ou Olympus BMAX60, com lâmpada HBO 100W, equipados com filtros para FITC, DAPI, rodamina e triplo. Na documentação dos resultados foi utilizado o filme Ektachrome 400 ASA (Kodak).

III.4. Critérios para contagem dos núcleos

Os critérios de análise foram seguidos de acordo com Eastmond *et al.* (1995) não sendo considerados núcleos sobrepostos ou danificados; sinais completamente separados foram contados como dois sinais e os incompletamente separados como um. Para análise foram consideradas somente lâminas que demonstraram pelo menos 80% de eficiência de hibridação.

Para estabelecer os limites de cortes entre as frequências normais de núcleos com um, dois, três ou mais sinais para cada sonda e a ocorrência de aneuploidias, foram calculadas as médias acrescidas de 4 desvios padrões ($\bar{x}+4s$) das amostras de células de descamação da bexiga e de linfócitos.



III.5. Análise Estatística

Para comparação das distribuições das porcentagens de células com diferentes números de sinais dos cromossomos 7, 9 e 17 foi aplicado o teste de qui-quadrado de homogeneidade, calculado a partir dos totais de células observadas com um, dois, três ou quatro sinais. Inicialmente esse teste foi aplicado entre as amostras de linfócitos (LFT) e células de descamação da bexiga (BXD), para estabelecer o grupo controle mais adequado. Também foi usado para comparação deste mesmo parâmetro, entre a amostra BXD com as amostras BXN, BXC e BXT. Foi fixado em 5% o nível crítico de rejeição (Vieira, 1985).

IV. Resultados



IV. RESULTADOS

Os dados referentes à análise citogenética foram obtidos utilizando-se as sondas dos cromossomos 7, 9 e 17, nos grupos controle constituídos por cinco amostras de células de epitélio da bexiga (BXN01 e BXN02) e cinco amostras de linfócitos cultivados (LFT) analisadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Nestas tabelas estão discriminadas as porcentagens de células com diferentes números de sinais, os totais de células analisadas em cada amostra e os totais de células com um, dois, três e quatro sinais, assim como estas porcentagens correspondentes, as quais foram utilizadas para elaboração dos histogramas. Após teste χ^2 de homogeneidade para comparação das distribuições das porcentagens de células com diferentes números de sinais dos cromossomos 7, 9 e 17, foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos controle para os cromossomos 7 ($\chi^2 = 15,5$; GL=2; $P < 0,05$) e 9 ($\chi^2 = 13,3$; GL=2; $P < 0,05$). Pela representação gráfica destas distribuições (Figura 2) pode-se observar que o grupo controle de linfócitos apresentou uma porcentagem maior de células com um e três sinais do cromossomo 7 e uma porcentagem também maior de células com apenas um sinal do cromossomo 9. Para o cromossomo 17 não observou-se diferença significativa ($\chi^2 = 4,4$; GL=2; $P < 0,05$). Portanto, optou-se em utilizar como valores normais as porcentagens médias de células dos referidos cromossomos. Os dados das células de descamação da bexiga por ocasião da remoção celular do tecido tumoral. Dessa forma, estabeleceu-se os limites do corte ($\pm 4\sigma$) para análises dos cromossomos 7, 9 e 17 (Tabela 7) respectivamente, sendo considerados como monossômicos os casos com mais de 46,8%, 22,8% e 44,1% e como trissômicos aqueles com valores acima de 1,5%, 7,5% e 4,5% de células com sinais dos cromossomos 7 e 9 considerando-se respectivamente, os valores acima de 0,5% e 1,3%. Como para o cromossomo 17 não observou-se diferença em ambas amostras controle, estabeleceu-se o limite de 0,5%.

IV. Resultados

Na Tabela 8 está sintetizada a análise referente às três amostras de tecido macroscopicamente normal da bexiga (BXN01, BXN02 e BXN03), retiradas respectivamente, de três pacientes submetidas à cirurgia com diagnóstico de células

IV. RESULTADOS

Os dados referentes a análise citogenética interfásica utilizando-se as sondas dos cromossomos 7, 9 e 17, nos grupos controles constituídos por cinco amostras de células de descamação da bexiga (BXD) e cinco amostras de linfócitos cultivados (LFT) estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Nestas tabelas estão discriminadas as porcentagens de células com diferentes números de sinais, os totais de células analisadas em cada amostra e os totais de células com um, dois, três e quatro sinais, assim como suas porcentagens correspondentes, as quais foram utilizadas para elaboração dos histogramas. Após teste X^2 de homogeneidade para comparação das distribuições das porcentagens de células com diferentes números de sinais dos cromossomos 7, 9 e 17, foram observadas diferenças significantes entre os dois grupos controles para os cromossomos 7 ($X^2 = 15,5$; GL= 2; $P > 0,05$) e 9 ($X^2 = 18,3$; GL= 2; $P > 0,05$). Pela representação gráfica destas distribuições (Figura 2) pode-se observar que o grupo controle de linfócitos apresentou uma porcentagem maior de células com um e três sinais do cromossomo 7 e uma porcentagem também maior de células com apenas um sinal do cromossomo 9. Para o cromossomo 17 não observou-se diferença significativa ($X^2 = 4,4$; GL=2; $P < 0,05$). Portanto, optou-se em utilizar como valores normais as porcentagens médias de cópias dos referidos cromossomos, obtidas nas células de descamação da bexiga, por constituir o mesmo tipo celular do tecido tumoral. Dessa forma, estabeleceu-se os limites de corte ($\bar{x} + 4s$) para aneuploidias dos cromossomos 7, 9 e 17 (Tabela 7) respectivamente, sendo considerados como monossômicos os casos com mais de 46,8%, 22,8% e 44,1% e como trissômicos, aqueles com valores acima de 1,5%, 7,5% e 6,2%. Para tetrassomia dos cromossomos 7 e 9 considerou-se respectivamente, os valores acima de 0,5% e 1,3%. Como para o cromossomo 17 não observou-se tetrassomia em ambas amostras controles, estabeleceu-se o limite de 0,5%.

Na Tabela 8 está sumarizada a análise referente as três amostras de tecido macroscopicamente normal da bexiga (BXN01, BXN02 e BXN03), retiradas respectivamente, de três pacientes submetidos à cirurgia com carcinoma de células transicionais (BXT13, BXT04 e BXT07) de um local distante da margem de

Tabela 5. Distribuição das porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 no grupo controle de células de descamação da bexiga.

Código	Cromossomo 7					Cromossomo 9					Cromossomo 17				
	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
BXD01	15,1	84,8	0,0	0,0	422	13,0	86,3	1,7	0,0	236	28,1	71,5	0,3	0,0	313
BXD02	31,8	67,3	0,3	0,3	308	6,7	92,0	1,5	0,0	344	26,1	72,3	1,4	0,0	206
BXD03	20,0	79,5	0,4	0,0	215	11,5	88,5	0,0	0,0	311	31,0	65,5	3,5	0,0	228
BXD04	19,6	80,3	0,0	0,0	316	13,0	82,7	3,9	0,6	306	19,3	80,0	0,6	0,0	320
BXD05	23,5	75,1	0,9	0,3	310	13,7	83,7	2,5	0,0	334	21,8	77,0	1,2	0,0	316
Total	340	1224	05	02	1571	111	1391	28	01	1531	343	1022	17	0	1382
%	21,6	77,9	0,3	0,1		7,2	91,0	1,8	0,06		24,8	73,9	1,2	0,0	

Tabela 6. Distribuição das porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 no grupo controle de linfócitos.

Código	Cromossomo 7					Cromossomo 9					Cromossomo 17				
	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
LFT01	22,4	74,2	2,7	0,6	334	7,2	89,8	3,0	0,0	326	30,6	67,4	2,1	0,0	291
LFT02	22,5	75,2	2,2	0,0	311	6,8	93,0	0,0	0,0	352	20,0	78,9	1,2	0,0	323
LFT03	22,1	77,8	0,0	0,0	321	6,4	91,0	3,0	0,0	307	30,8	67,7	1,4	0,0	356
LFT04	28,1	70,5	1,2	0,0	316	8,6	90,0	0,9	0,3	318	29,2	70,8	0,0	0,0	449
LFT05	29,4	69,2	1,0	0,5	211	7,2	90,0	2,7	0,0	330	28,7	71,0	0,4	0,0	233
Total	367	1101	22	03	1493	191	1408	32	02	1633	461	1175	16	0	1652
%	24,5	73,7	1,5	0,2		11,7	86,2	1,9	0,1		27,9	71,1	0,9	0,0	

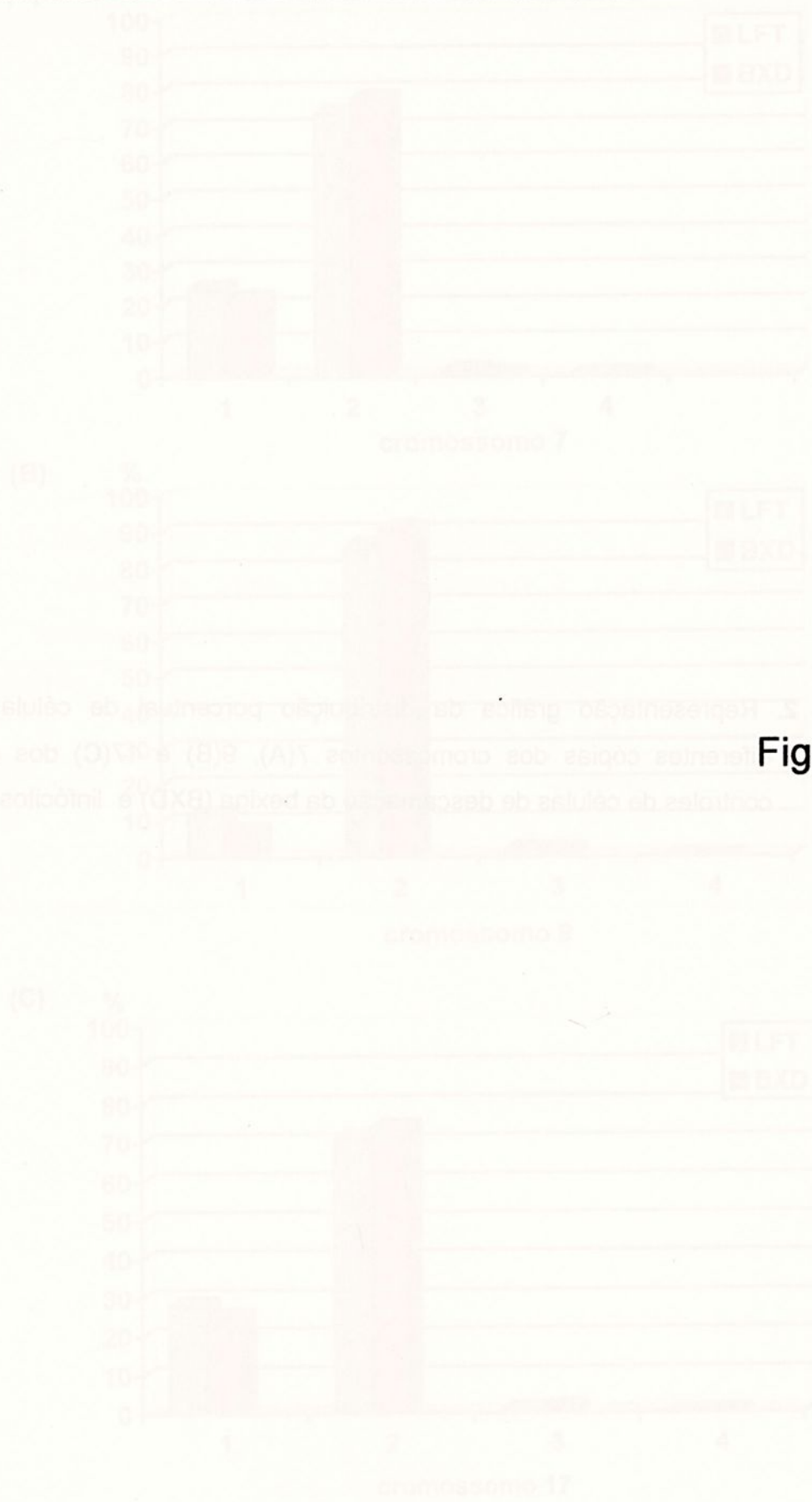
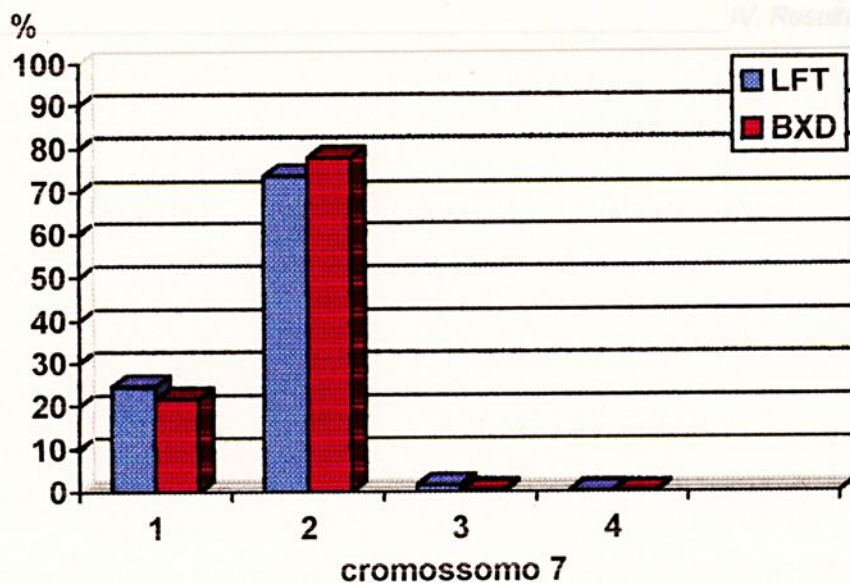


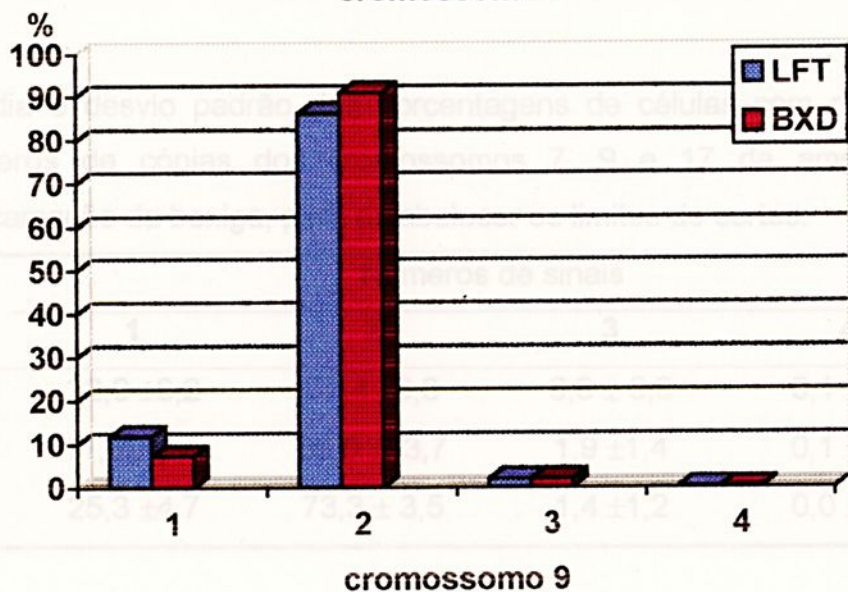
Figura 2

Figura 2. Representação gráfica da distribuição porcentual de células com diferentes cópias dos cromossomos 7(A), 9(B) e 17(C) dos grupos controles de células de descamação da bexiga (BXD) e linfócitos (LFT).

(A)



(B)



(C)

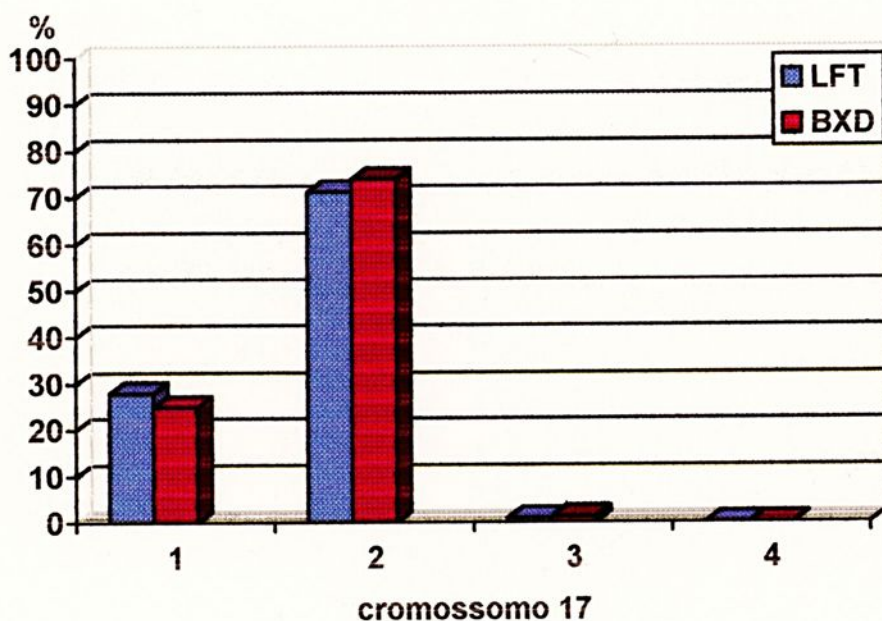


Tabela 8. Distribuição das porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 no grupo de ledo normal da bexiga.

Tabela 7. Média e desvio padrão das porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 da amostra de descamação da bexiga, para estabelecer os limites de cortes.

Cromossomos	Números de sinais			
	1	2	3	4
7	22,0 $\pm$ 6,2	77,4 $\pm$ 6,6	0,3 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,1
9	11,6 $\pm$ 2,8	86,6 $\pm$ 13,7	1,9 $\pm$ 1,4	0,1 $\pm$ 0,3
17	25,3 $\pm$ 4,7	73,3 $\pm$ 3,5	1,4 $\pm$ 1,2	0,0 $\pm$ 0,0

segurança do tumor. Nessas amostras observou-se trissomia 7 nos três casos, cuja variação de núcleos com três sinais foi de 1,8% a 19,1%. O caso BXN01 também apresentou tetrasomia 7 assim como trissomias 9 e 17 e no caso BXN02 também constatou-se tetrasomia 7.

Na Tabela 8 estão apresentadas as porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17, nas quatorze amostras de tumores (BXT) e nas duas células adjacentes (BXC). Nas amostras a variação da porcentagem de núcleos com um, três e quatro sinais do cromossomo 7 foi respectivamente de 0,8% a 43,3%, de 0,3% a 35% e de 0% a 48,0%.

Tabela 8. Distribuição das porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 no grupo de tecido normal da bexiga.

Código	Cromossomo 7					Cromossomo 9					Cromossomo 17				
	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
BXN01	20,3	64,0	12,0	3,7	266	9,0	81,1	8,3	1,6	312	13,7	75,0	6,3	5,3	285
BXN02	2,7	76,8	19,1	1,3	298	7,9	90,5	1,2	0,0	339	25,0	71,2	2,7	0,0	362
BXN03	13,6	84,5	1,8	0,0	330	8,1	88,2	3,0	0,7	316	22,5	75,5	1,9	0,0	315
Total	107	678	95	14	894	80	843	39	05	967	204	709	34	15	962
%	12,0	75,8	10,6	1,5		8,3	87,1	4,0	0,5		21,2	73,7	3,5	1,5	

segurança do tumor. Nessas amostras observou-se trissomia 7 nos três casos, cuja variação de núcleos com três sinais foi de 1,8% a 19,1%. O caso BXN01 também apresentou tetrassomia 7 assim como trissomias e tetrassomias 9 e 17 e no caso BXN02 também constatou-se tetrassomia 7.

Na Tabela 9 estão apresentadas as porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17, nas quatorze amostras de tumores (BXT) e nas duas cistites analisadas (BXC). Nestas amostras a variação da porcentagem de núcleos com um, três e quatro sinais do cromossomo 7 foi respectivamente de 0,6% a 43,3%, de 0,3% a 35% e de 0% a 48,0%.

Nestes casos, não foi observada monossomia do cromossomo 7. Quatorze amostras (87,5%), ou seja doze carcinomas (BXT01, BXT03, BXT05, BXT06, BXT07, BXT08, BXT09, BXT10, BXT11, BXT12, BXT13, BXT14) e as duas cistites (BXC01 e BXC02) apresentaram trissomia para este cromossomo. Dentre estes casos, oito (50,0%) BXT03, BXT05, BXT08, BXT11, BXT12, BXT13, BXT14 e BXC01 também apresentaram tetrassomia 7.

Quanto ao cromossomo 9, detectou-se monossomia (Figura 3) em seis casos (37,5%), sendo quatro carcinomas (BXT04, BXT05, BXT08 e BXT12) e as duas cistites (BXC01 e BXC02), com 26,4% a 63,2% dos núcleos apresentando apenas uma cópia deste cromossomo. Em cinco outros casos (31,2%), todos referentes aos tumores (BXT07, BXT09, BXT11, BXT13 e BXT14), observou-se trissomia e tetrassomia 9, com variação de 8,8% a 58,3% dos núcleos apresentando três cópias e 1,4% a 55,2% com quatro cópias do cromossomo 9.

A análise do cromossomo 17 não evidenciou monossomia nos tumores e nem nas cistites. Entretanto, sete amostras de tecido tumoral (43,7%) foram trissômicas (BXT03, BXT04, BXT05, BXT07, BXT11, BXT13 e BXT14) com variação de 6,3% a 50,1% dos núcleos apresentando três cópias do cromossomo 17. Também detectou-se tetrassomia em cinco casos (35,7%), um dos quais a amostra de cistite (BXC01) e os demais constituídos por tecido tumoral (BXT04, BXT05, BXT12, BXT13 e BXT14), cuja variação de núcleos com quatro sinais foi de 0,8% a 21,7%.

Tabela 9. Distribuição das porcentagens de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 nos carcinomas e nas cistites.

Código	Cromossomo 7					Cromossomo 9					Cromossomo 17				
	% células c/ sinais				total célula	% células c/ sinais				total células	% células c/ sinais				total células
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
Carcinomas:															
BXT01	43,3	52,3	4,4	0,0	321	1,9	97,0	0,5	0,0	368	21,0	77,2	2,0	0,0	364
BXT02	3,5	96,2	0,3	0,0	317	3,9	92,4	3,1	0,0	381	24,5	74,2	1,3	0,0	302
BXT03	16,9	69,5	11,3	2,3	213	9,2	90,0	0,7	0,0	293	14,8	73,0	12,1	0,0	222
BXT04	16,0	83,0	1,1	0,0	351	51,5	44,9	3,6	0,0	363	13,3	69,2	16,6	0,8	354
BXT05	8,8	84,6	4,4	2,0	339	63,2	33,8	2,9	0,0	343	7,6	59,0	28,7	4,5	352
BXT06	0,6	67,2	32,0	0,0	333	9,9	88,8	1,2	0,0	322	11,7	84,2	4,0	0,0	324
BXT07	17,0	77,0	6,0	0,0	316	6,7	82,1	9,8	1,4	358	18,8	74,8	6,3	0,0	346
BXT08	22,7	69,8	4,6	2,1	325	26,4	68,6	4,9	0,0	367	25,1	73,3	1,4	0,0	342
BXT09	7,3	89,2	3,3	0,0	326	3,2	61,2	32,7	3,0	348	13,9	85,7	0,3	0,0	343
BXT10	7,6	89,8	2,4	0,0	326	5,4	90,2	3,7	0,5	349	17,3	82,0	0,6	0,0	323
BXT11	2,1	24,7	27,5	45,5	327	1,6	28,1	58,3	12,0	302	3,6	41,8	50,1	0,0	387
BXT12	34,4	62,2	3,0	0,6	311	26,4	73,5	0,0	0,0	348	37,1	58,4	3,5	1,0	310
BXT13	1,5	34,1	16,1	48,0	334	0,0	36,0	8,8	55,2	317	6,3	57,8	14,1	21,7	332
BXT14	2,6	60,7	35,0	1,6	311	0,9	25,4	28,2	45,3	311	11,0	61,1	25,8	2,0	309
Total	578	3056	480	336	4450	900	2986	515	369	4770	734	3186	573	117	4610
%	13,0	68,7	10,7	7,5		18,8	62,5	10,8	7,7		15,9	69,1	12,4	2,5	
Cistites:															
BXC01	31,6	63,0	4,2	1,3	313	29,6	70,0	0,4	0,0	263	30,7	58,7	5,5	1,0	308
BXC02	15,4	81,0	3,3	0,3	330	29,7	68,5	1,7	0,0	292	15,7	82,3	1,9	0,0	266
Total	150	464	24	5	643	165	384	06	0	555	149	400	22	03	574
%	23,3	72,1	3,7	0,8		29,7	69,2	1,1	0,0		25,9	69,7	3,8	0,5	

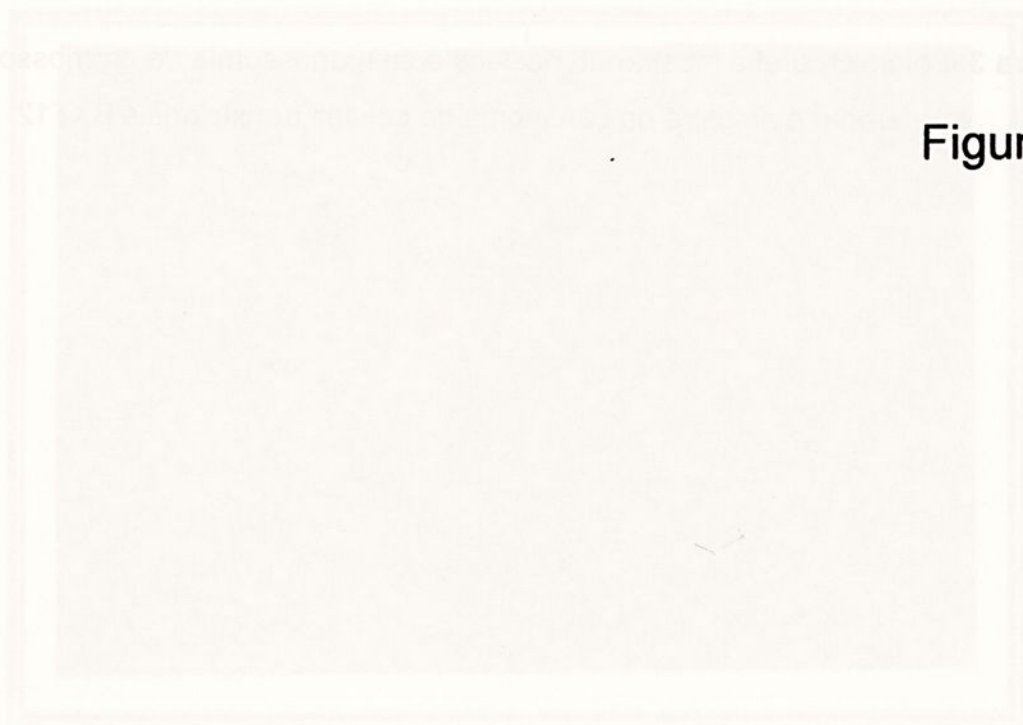


Figura 3

Figura 3. Fotomicrografia mostrando núcleos com monossomia do cromossomo 9, referente à amostra de carcinoma de células transicionais BXT12.



Deve-se ressaltar que os casos BXT13 (Figura 4) e BXT14 (Figura 5) correspondendo respectivamente, a um CCT grau IV invasivo e a um carcinoma anaplásico indiferenciado, apresentaram tetrassomias dos cromossomos 7, 9 e 17, sugerindo portanto, tratar-se de tumores com tetraploidia (4n). Para reforçar se nesses casos ocorriam tetraploidia, foi realizada hibridação simultânea com as sondas dos cromossomos 7 e 9, e 9 e 17, marcadas com fluorocromos diferentes. Entretanto, devido a ineficiência da hibridação só foi possível a análise do caso BXT13 e da mucosa urotelial normal correspondente (BXN01). No carcinoma BXT13, dos 52 núcleos analisados, 52% deles apresentaram oito sinais, correspondendo a quatro sinais do cromossomo 7 (amarelo) e quatro da cromossomo 9 (rosa). Na mucosa macroscopicamente normal do mesmo paciente, analisou-se 143 núcleos, dos quais 54% apresentaram também oito sinais, referentes às marcações pelas duas sondas (Figura 6). Portanto, reforçando a possibilidade da ocorrência de tetraploidia.

O caso BXT11 (CCT grau III), também apresentou tetrassomia dos cromossomos 7 e 9 (45,5% e 12,0%), mas não do cromossomo 17, não podendo ser caracterizado como tendo tetraploidia.

Na Tabela 10 estão resumidas as alterações cromossômicas numéricas encontradas nas quatorze amostras de carcinomas da bexiga, em relação ao tipo histológico, grau do tumor e outras informações como, se o tumor é primário ou recidiva; nas duas amostras de cistite crônica e nas três amostras de tecido normal da bexiga.

Considerando-se todas as amostras estudadas, apenas o caso BXT02, referente a um CCT grau I não apresentou anomalias numéricas para os cromossomos avaliados. A alteração mais freqüente foi a trissomia 7, observada em 89,5% (14/19) das amostras incluindo os carcinomas, as cistites e as três amostras consideradas como tecido normal da bexiga. Em seguida, em ordem decrescente de freqüência, a tetrassomia 7 foi detectada em 52,6% das amostras (10/19), a trissomia 17 em 42,1% (8/19), as monossomia e trissomia 9, em 31,5% (6/19), seguidas pelas tetrassomias 17 e 9, com freqüências de 36,8% (7/19) e 31,5% (6/19), respectivamente.

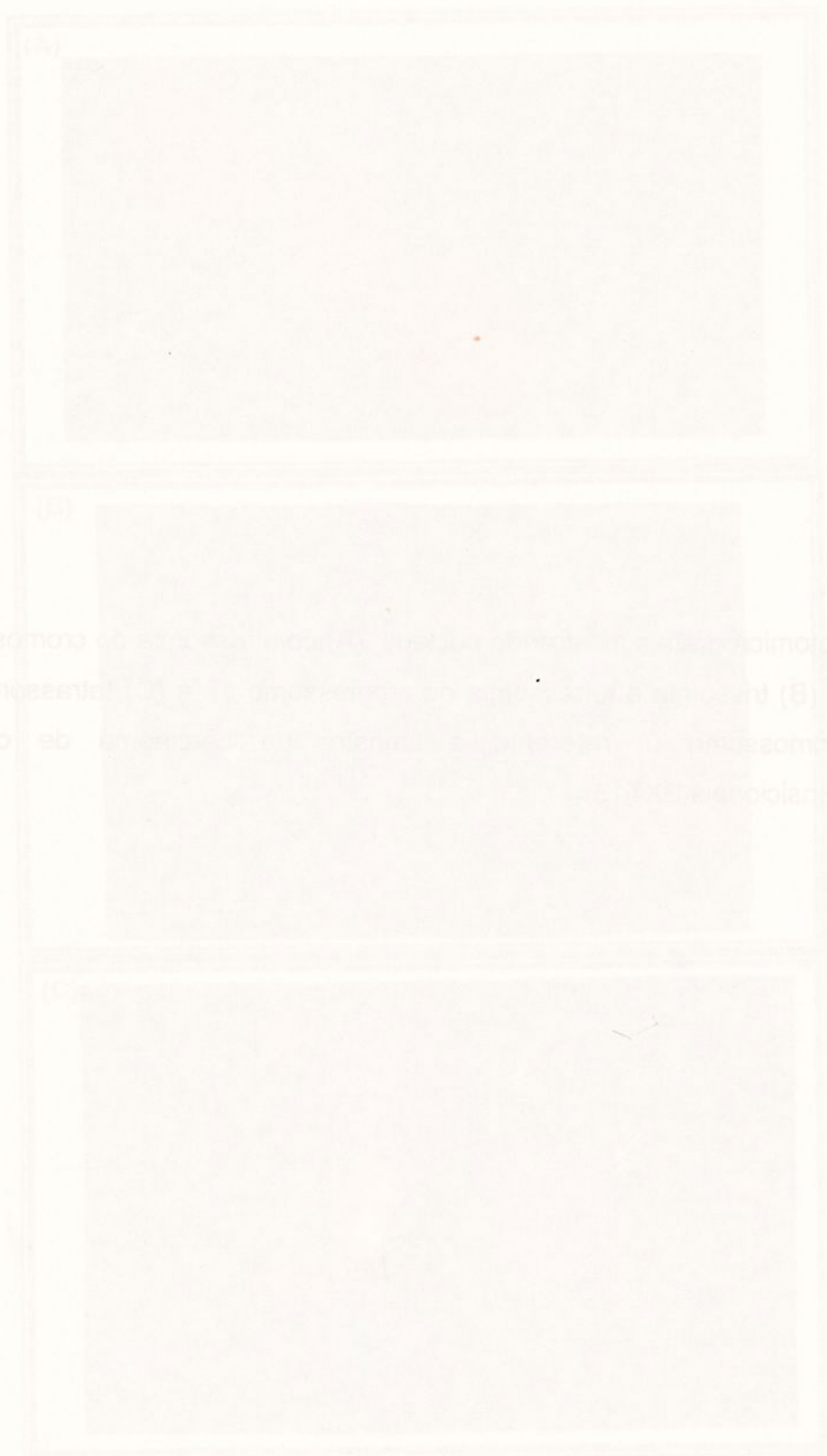
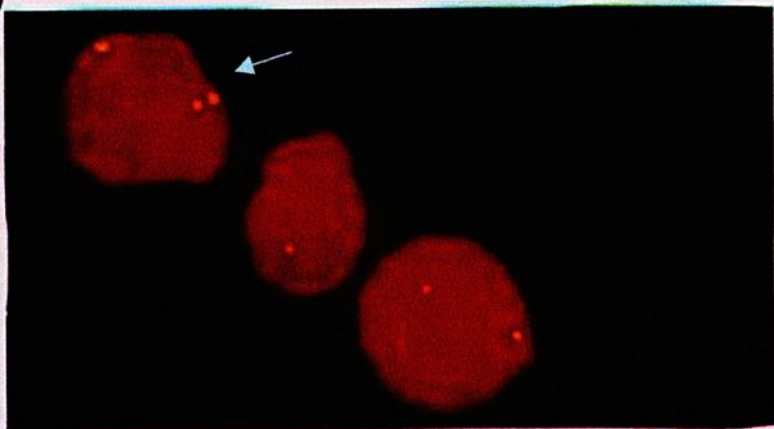


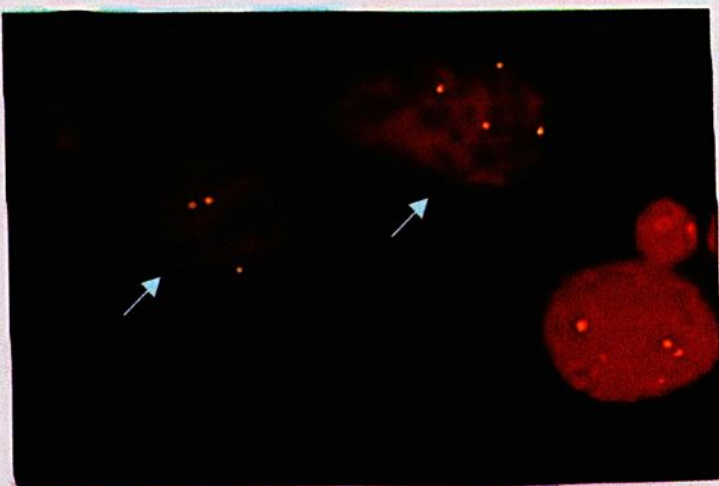
Figura 4

Figura 4. Fotomicrografias mostrando núcleos: (A) com trissomia do cromossomo 7; (B) trissomia e tetrassomia do cromossomo 17 e (C) tetrassomia do cromossomo 9, referente à amostra de carcinoma de células transicionais BXT13.

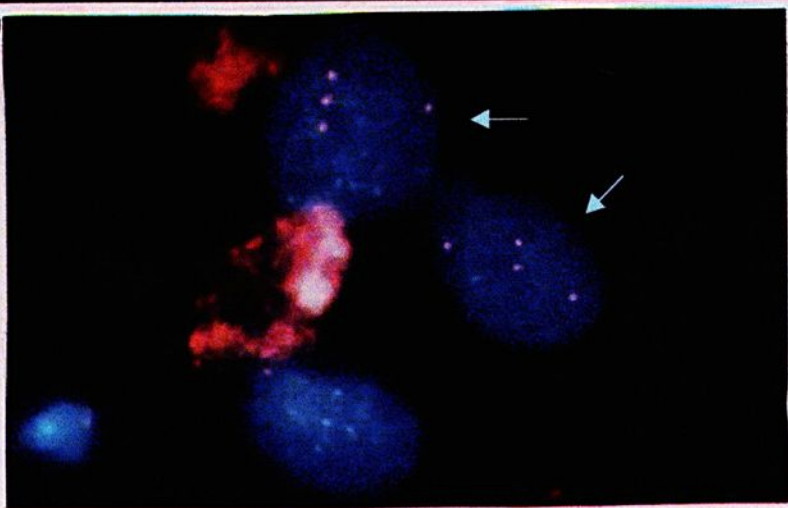
(A)



(B)



(C)



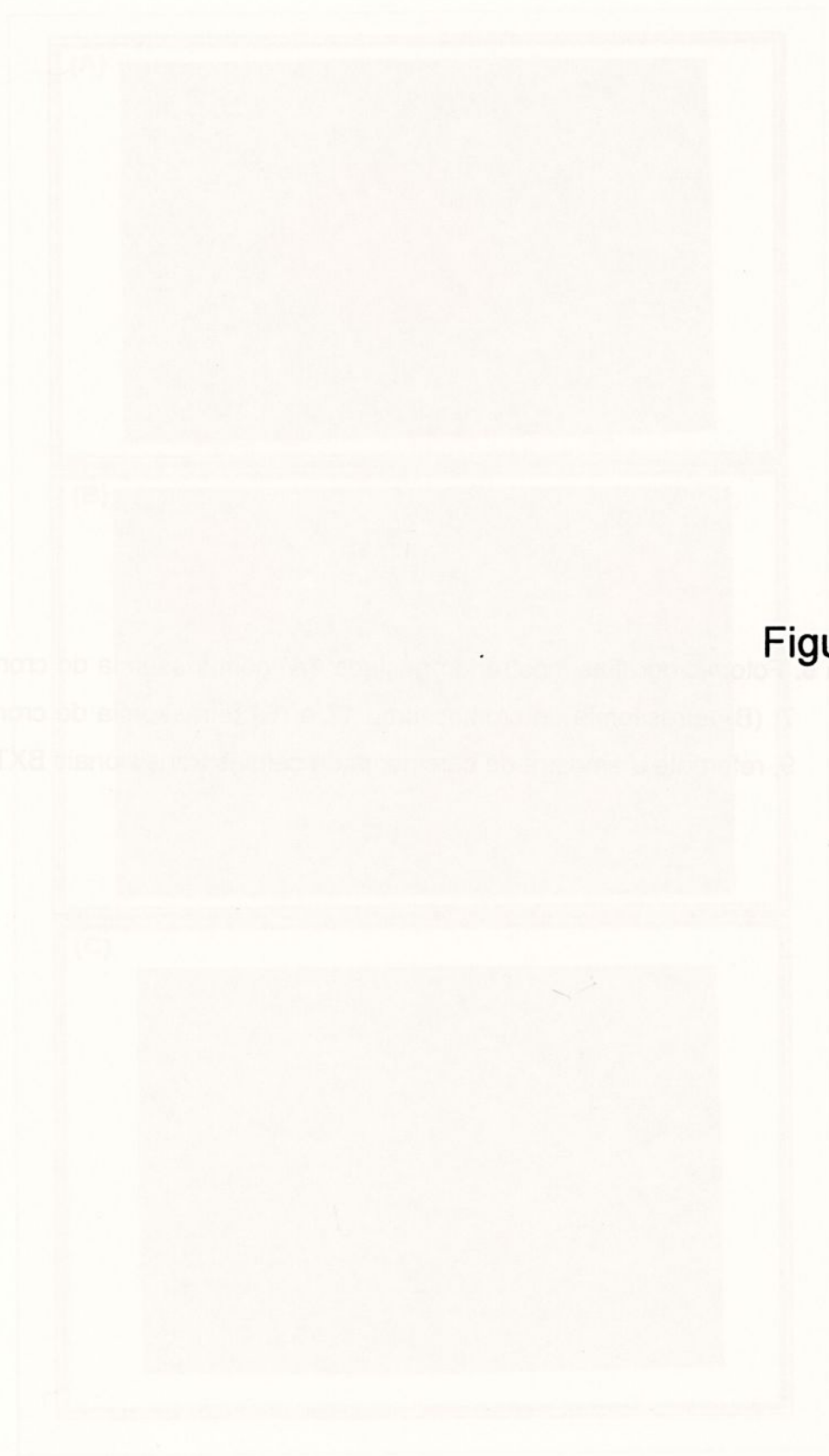
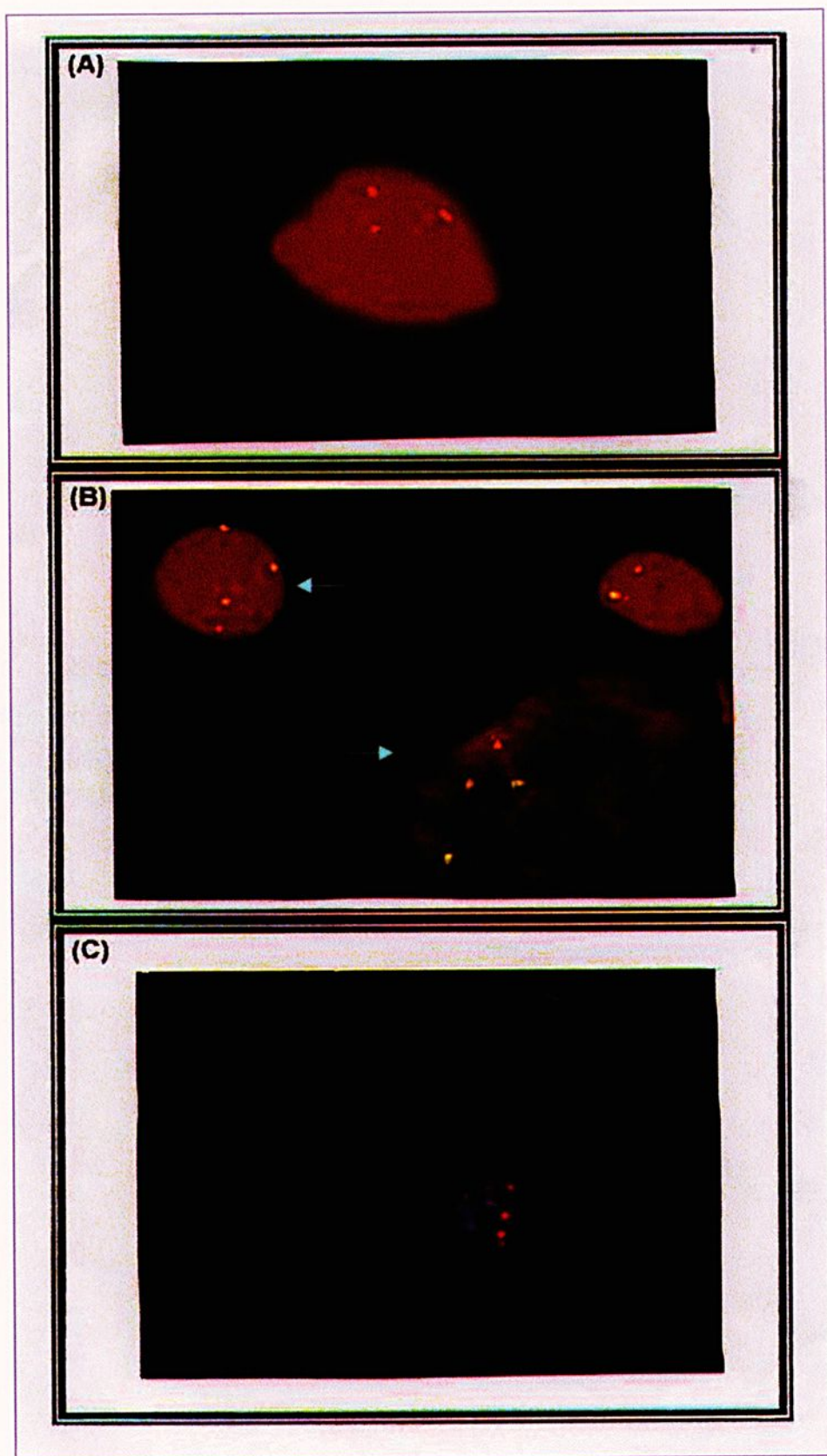


Figura 5

Figura 5. Fotomicrografias mostrando núcleos: (A) com trissomia do cromossomo 7; (B) tetrassomia do cromossomo 17 e (C) tetrassomia do cromossomo 9, referente a amostra de carcinoma de células transicionais BXT14.



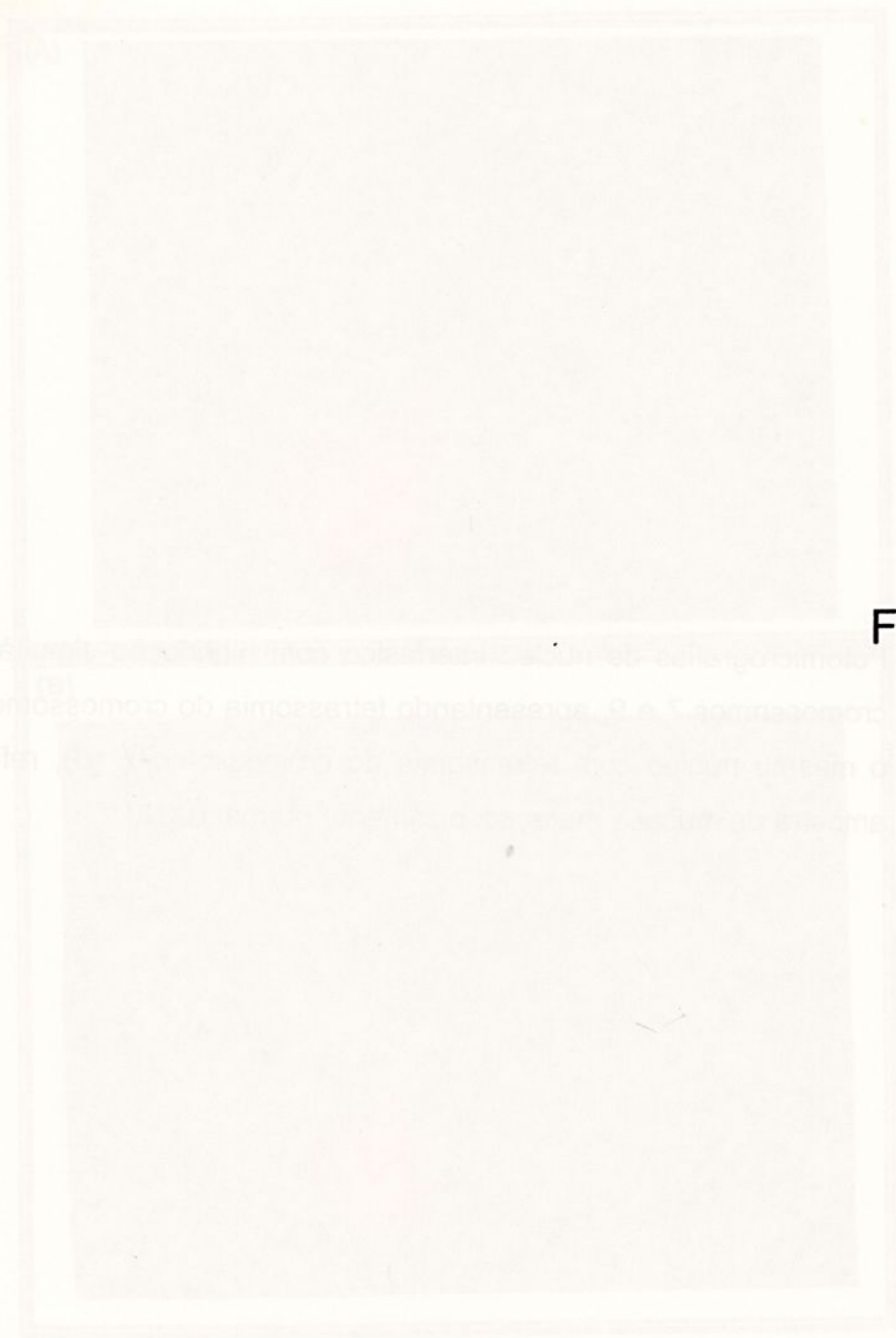
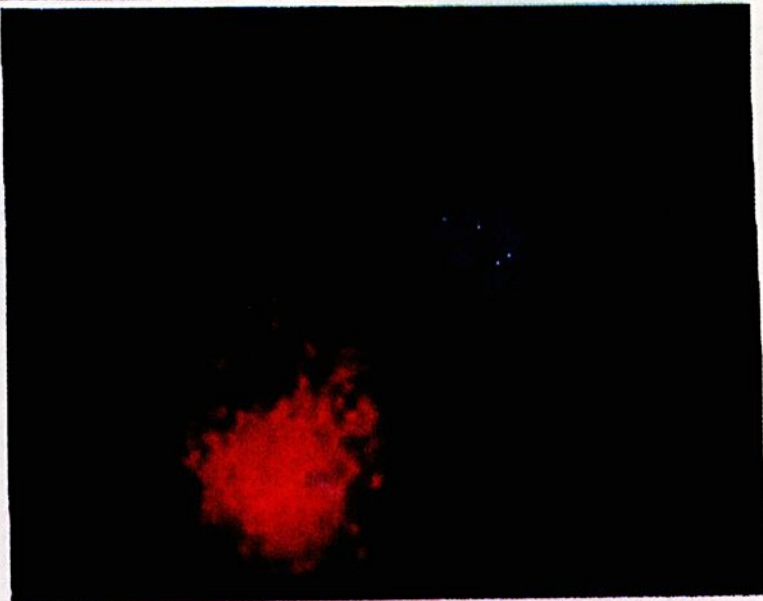


Figura 6

Figura 6. Fotomicrografias de núcleo interfásico com hibridação simultânea dos cromossomos 7 e 9, apresentando tetrassomia do cromossomo **9** (A) e o mesmo núcleo com tetrassomia do cromossomo **7** (B), referente a amostra de mucosa macroscopicamente normal BXN01.

(A)



(B)

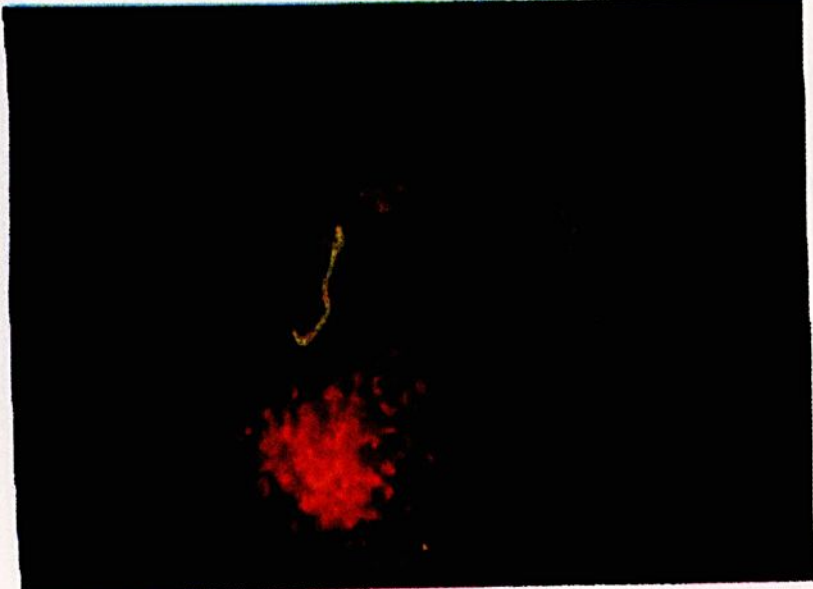


Tabela 10. Anomalias numéricas nas amostras de carcinomas da bexiga, cistites e tecido normal da bexiga em relação ao tipo histológico, grau do tumor e recidivas.

Código	Tipo Histológico	Grau	Outras informações	Aneuploidias
Carcinomas:				
BXT01	CCT	I	primário	+7
BXT02	CCT	I	1ª rec.	—
BXT03	CCT	I	4ª rec.	+7/+7x2, +17
BXT04	CCT	I	primário	-9, +17/+17x2
BXT05	CCT	I	3ª rec.	+7/+7x2, -9, +17/+17x2
BXT06	CCT	II	1ª rec.	+7
			(invasivo e ulcerado).	
BXT07	CCT	II	primário	+7, +9/+9x2, +17
BXT08	CCT	II	primário, invasivo (lâmina própria)	+7/+7x2, -9
BXT09	CCT	II	4ª rec. (invasivo)	+7, +9/+9x2
BXT10	CCT	II	1ª rec.	+7
BXT11	CCT	III	primário, invasivo	+7/+7x2, +9/+9x2, +17
BXT12	CCT	IV	primário, invasivo	+7/+7x2, -9, +17x2
BXT13	CCT	IV	primário (invasivo, necrótico)	+7/+7x2, +9/+9x2, +17/+17x2
BXT14	CAI	Alto grau	primário, invasivo	+7/+7x2, +9/+9x2, +17/+17x2
Cistites:				
BXC01	CCI	-	1ª rec.	+7/+7x2, -9, +17x2
BXC02	CCI	-	4ª rec.	+7, -9
Normal:				
BXN01	Normal	-	-	+7/+7x2, +9/+9x2, +17/+17x2
BXN02	Normal	-	-	+7/+7x2
BXN03	Normal	-	-	+7

CCT=carcinoma de células transicionais; CAI=carcinoma anaplásico indiferenciado; CCI=cistite crônica inespecífica; rec.=recidiva.

Comparando-se as três amostras de tecido normal da bexiga com os respectivos tumores, pode-se observar que a amostra BXN03 apresentou apenas trissomia 7, também presente no tumor (BXT07), que além dessa anomalia apresentou alterações dos cromossomos 9 e 17. A amostra BXN02 apresentou trissomia e tetrassomia 7, não detectadas no tecido tumoral (BXT04), mas que tinha alterações nos cromossomos 9 e 17. Na amostra BXN01, foram observadas as mesmas anomalias numéricas encontradas no tumor correspondente (BXT13), um CCT grau IV invasivo e necrótico. Nesse caso, devendo-se questionar o significado destas alterações, observadas no tecido supostamente normal.

Nas lesões inflamatórias crônicas, ou seja, os dois casos de cistite, a amostra BXC02 apresentou poucas anomalias (+7 e -9), enquanto, na amostra BXC01, foram detectadas alterações envolvendo os três cromossomos.

Quando compara-se os CCT de baixo grau (I) com os mais invasivos, graus II, III, IV e o CAI, verifica-se um maior número de alterações nos tumores de alto grau. Entre os CCT graus I e II, apenas as amostras BXT05 (grau I) e BXT07 (grau II) apresentaram vários tipos de alterações, envolvendo os cromossomos 7, 9 e 17. Nos demais tumores graus I e II além da trissomia 7, presente em quase todos os casos, também verificou-se aneuploidias no cromossomo 9. Contudo, nos tumores de alto grau (III e IV) foi comum as trissomias e tetrassomias dos cromossomos 7, 9 e 17.

Também foram comparadas por teste X^2 de homogeneidade, as distribuições de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17, referente aos grupos de células de descamação da bexiga (BXD), tecido normal (BXN), cistite (BXC) e carcinomas (BXT), para verificar se haviam diferenças entre esses grupos, independente dos casos que já foram destacados como aneuplóides. A representação gráfica destas distribuições estão apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9.

Comparando-se as três amostras de tecido normal da bexiga (BXN) com o grupo controle (BXD) observou-se diferenças significantes para os três cromossomos (cr. 7: $X^2=196,5$, GL=2, $P>0,05$; cr.9: $X^2=15,9$, GL=2, $P>0,05$; cr.17: $X^2=33,1$, GL=2, $P>0,05$). Na figura 7 observa-se uma frequência maior de células

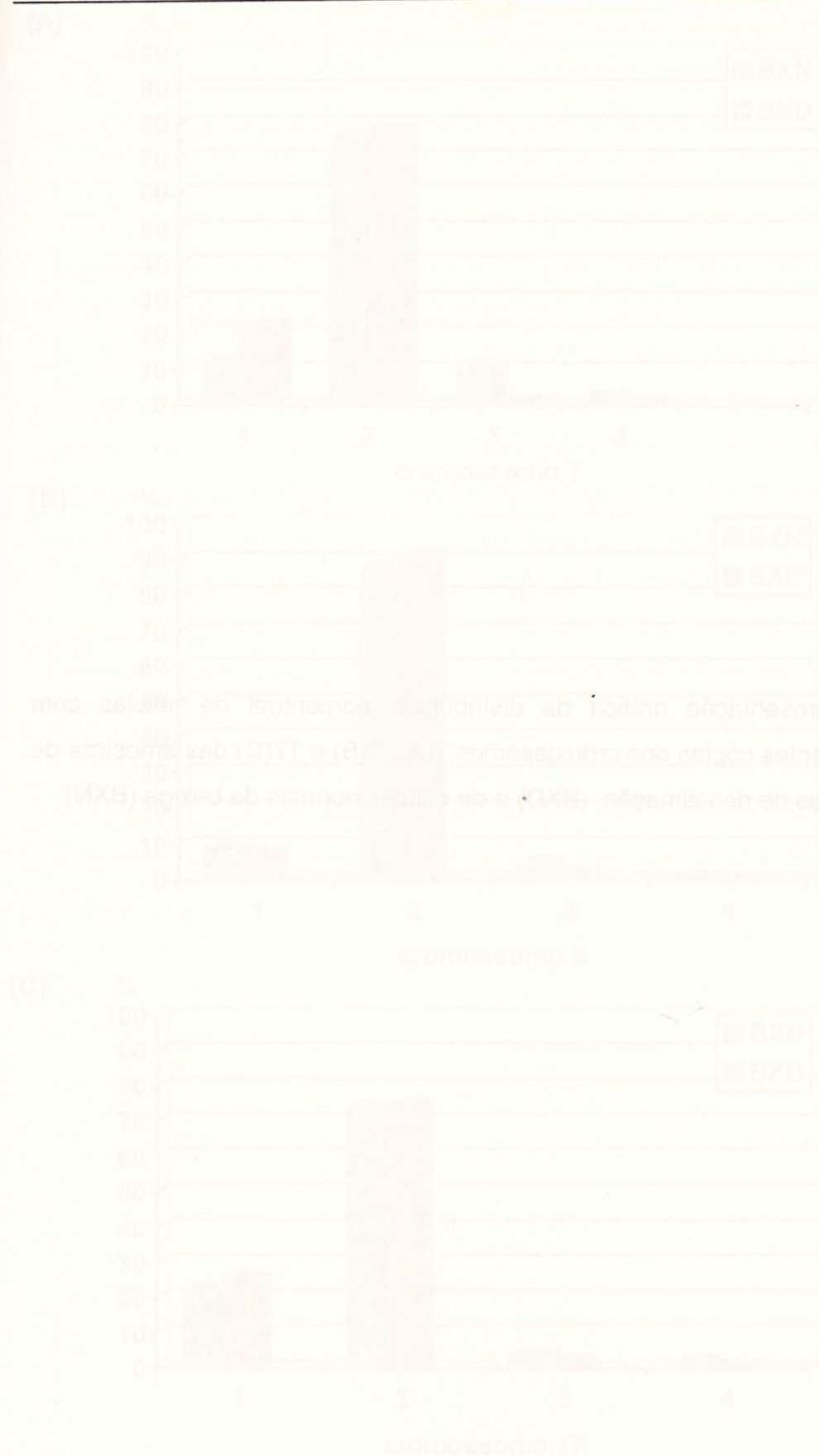
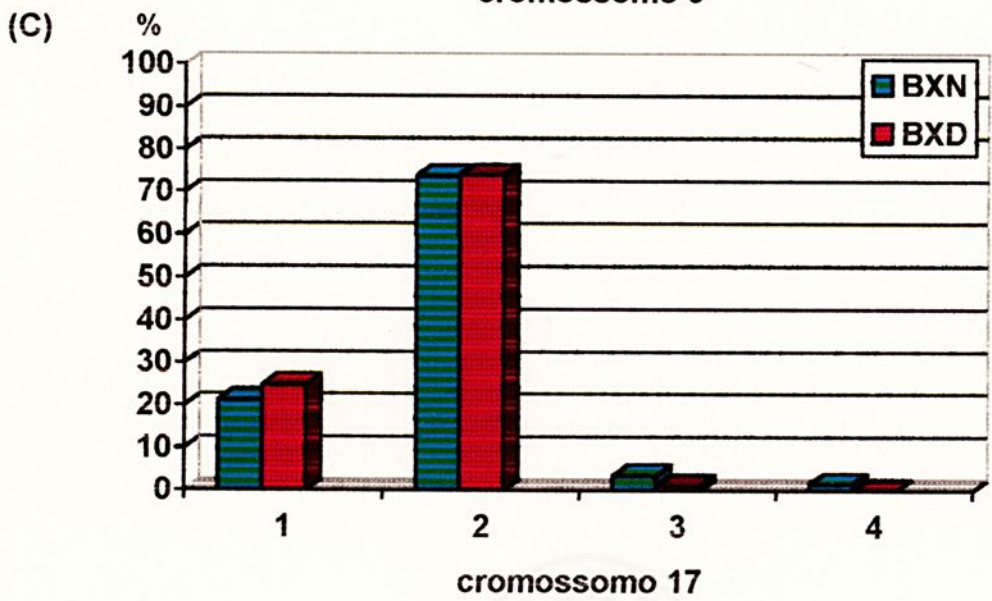
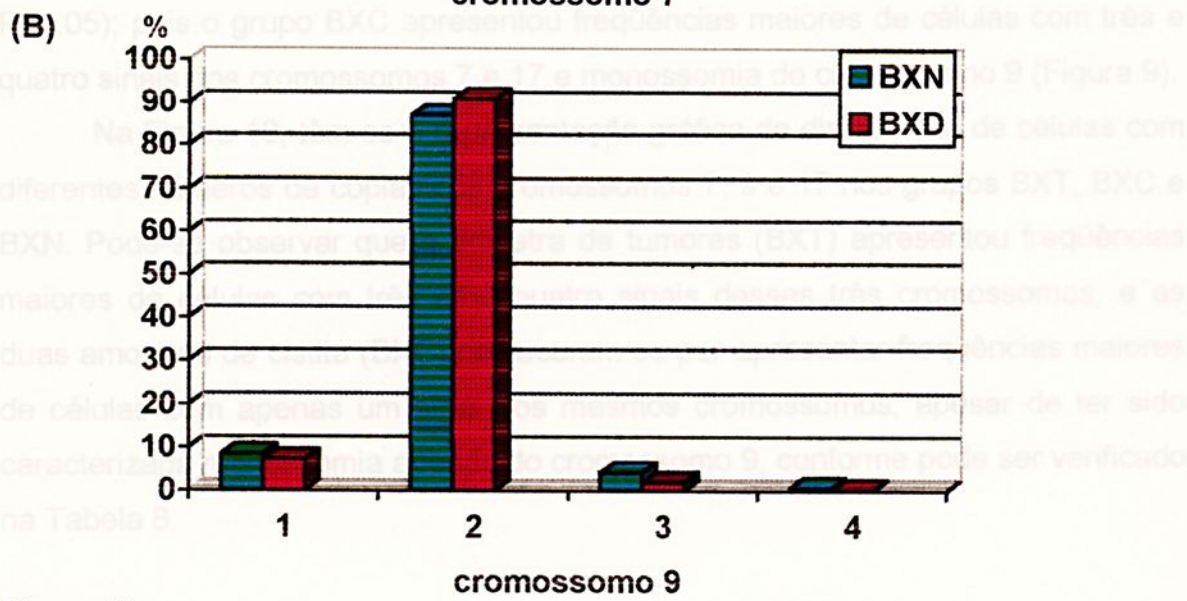
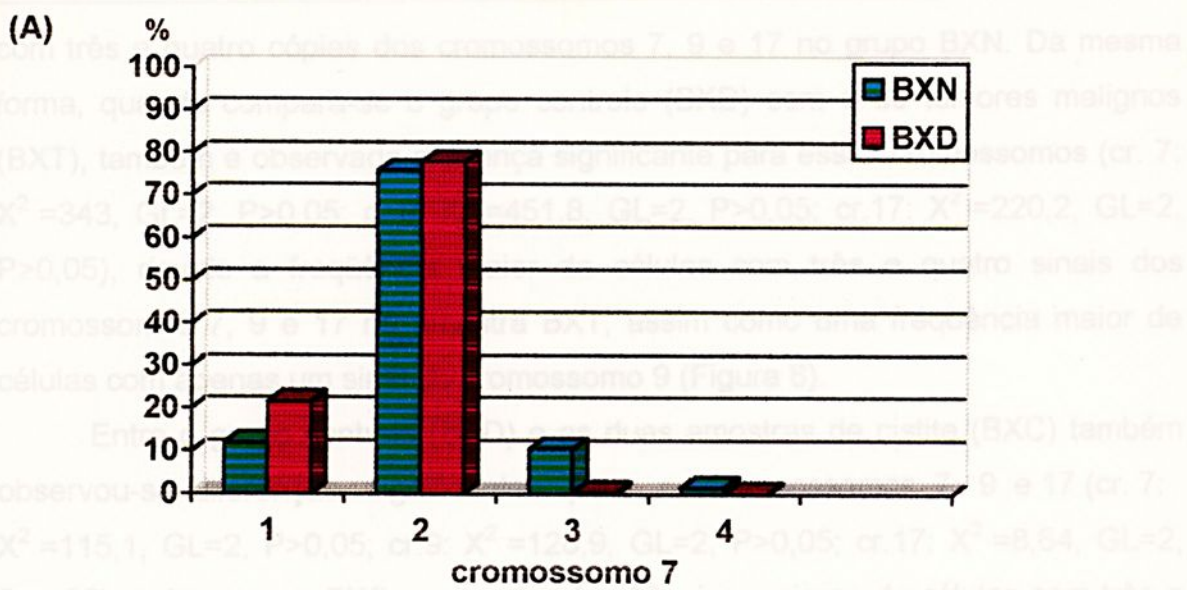


Figura 7

Figura 7. Representação gráfica da distribuição porcentual de células com diferentes cópias dos cromossomos 7(A), 9(B) e 17(C) das amostras de células de descamação (BXD) e de células normais da bexiga (BXN).



com três e quatro cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 no grupo BXN. Da mesma forma, quando compara-se o grupo controle (BXD) com o de tumores malignos (BXT), também é observada diferença significativa para esses cromossomos (cr. 7: $X^2 = 343$, GL=2, $P > 0,05$; cr. 9: $X^2 = 451,8$, GL=2, $P > 0,05$; cr. 17: $X^2 = 220,2$, GL=2, $P > 0,05$), devido a frequência maior de células com três e quatro sinais dos cromossomos 7, 9 e 17 na amostra BXT, assim como uma frequência maior de células com apenas um sinal do cromossomo 9 (Figura 8).

Entre o grupo controle (BXD) e as duas amostras de cistite (BXC) também observou-se diferenças significantes para os cromossomos 7, 9 e 17 (cr. 7: $X^2 = 115,1$, GL=2, $P > 0,05$; cr. 9: $X^2 = 128,9$, GL=2, $P > 0,05$; cr. 17: $X^2 = 8,64$, GL=2, $P > 0,05$); pois o grupo BXC apresentou frequências maiores de células com três e quatro sinais dos cromossomos 7 e 17 e monossomia do cromossomo 9 (Figura 9).

Na Figura 10, têm-se a representação gráfica da distribuição de células com diferentes números de cópias dos cromossomos 7, 9 e 17 nos grupos BXT, BXC e BXN. Pode-se observar que a amostra de tumores (BXT) apresentou frequências maiores de células com três e/ou quatro sinais desses três cromossomos, e as duas amostras de cistite (BXC) destacaram-se por apresentar frequências maiores de células com apenas um sinal dos mesmos cromossomos, apesar de ter sido caracterizada monossomia apenas do cromossomo 9, conforme pode ser verificado na Tabela 8.



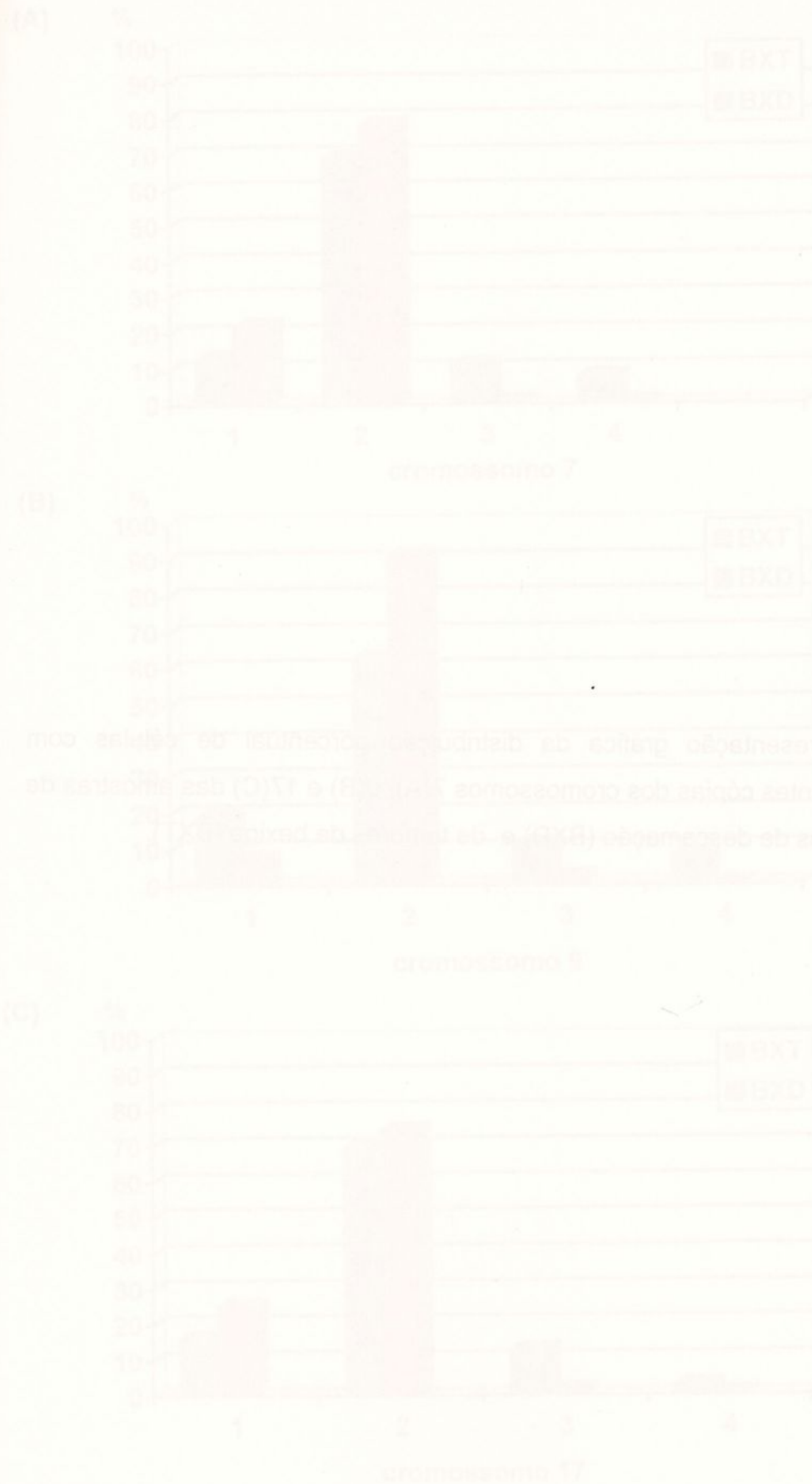


Figura 8

Figura 8. Representação gráfica da distribuição porcentual de células com diferentes cópias dos cromossomos 7(A), 9(B) e 17(C) das amostras de células de descamação (BXD) e de tumores da bexiga (BXT).

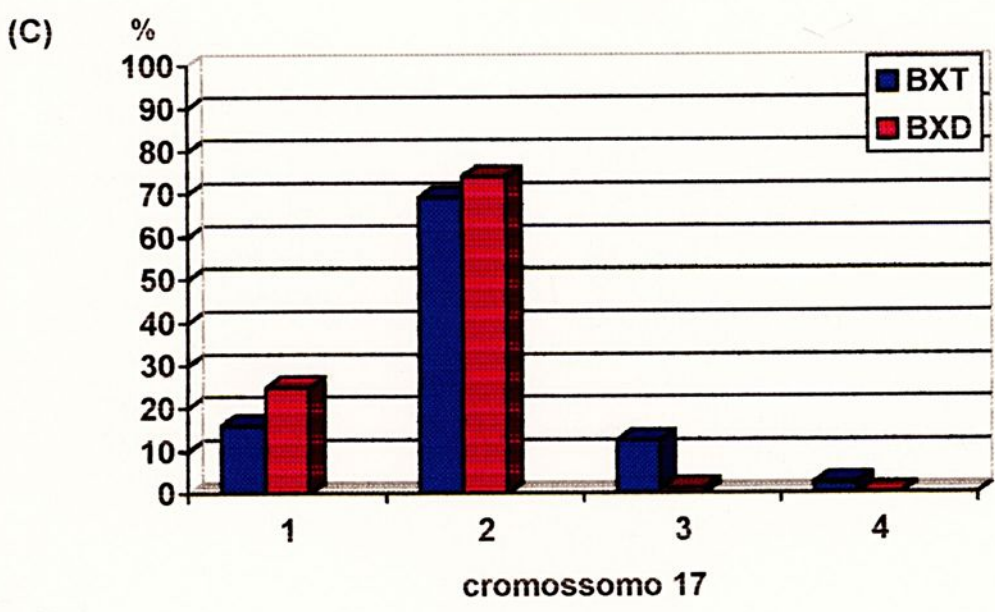
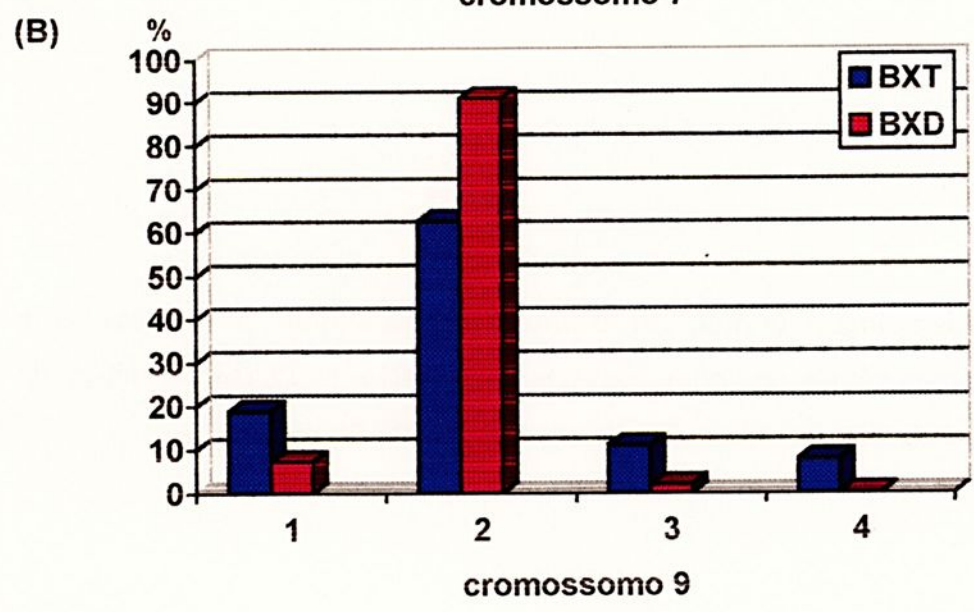
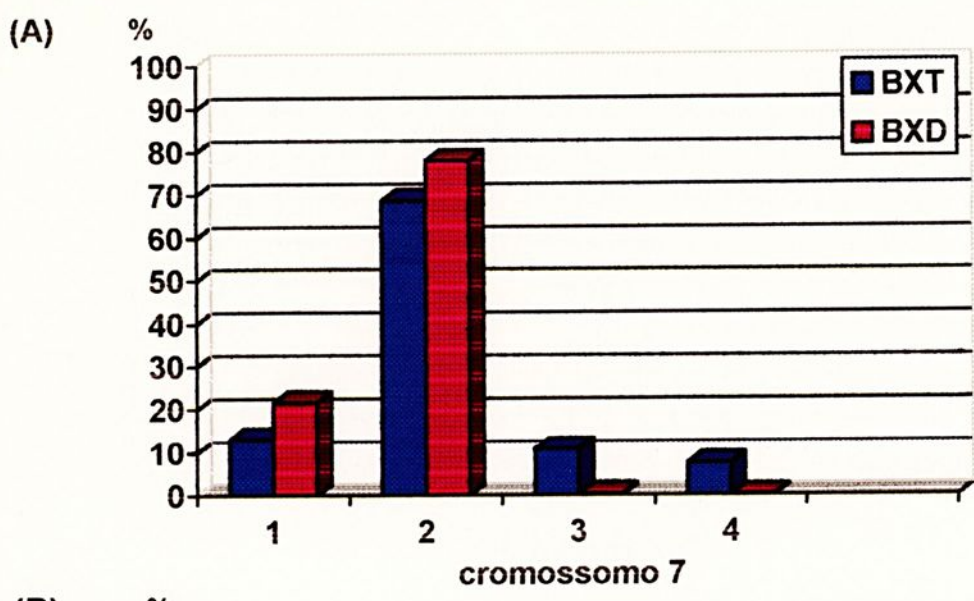


Figura 9



Figura 9

Figura 9. Representação gráfica da distribuição porcentual de células com diferentes cópias dos cromossomos 7(A), 9(B) e 17(C) das amostras de células de descamação (BXD) e de cistite (BXC).

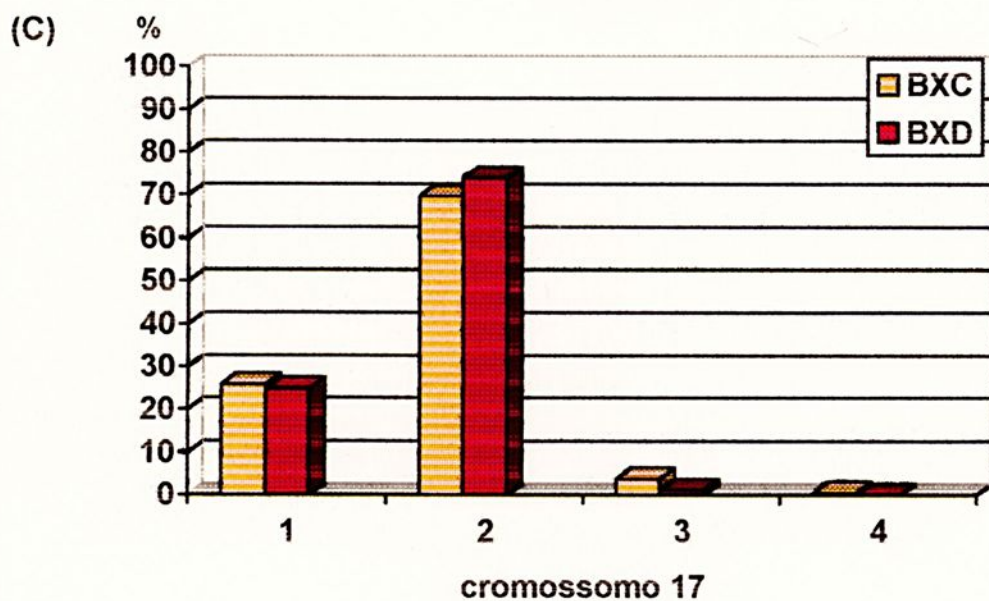
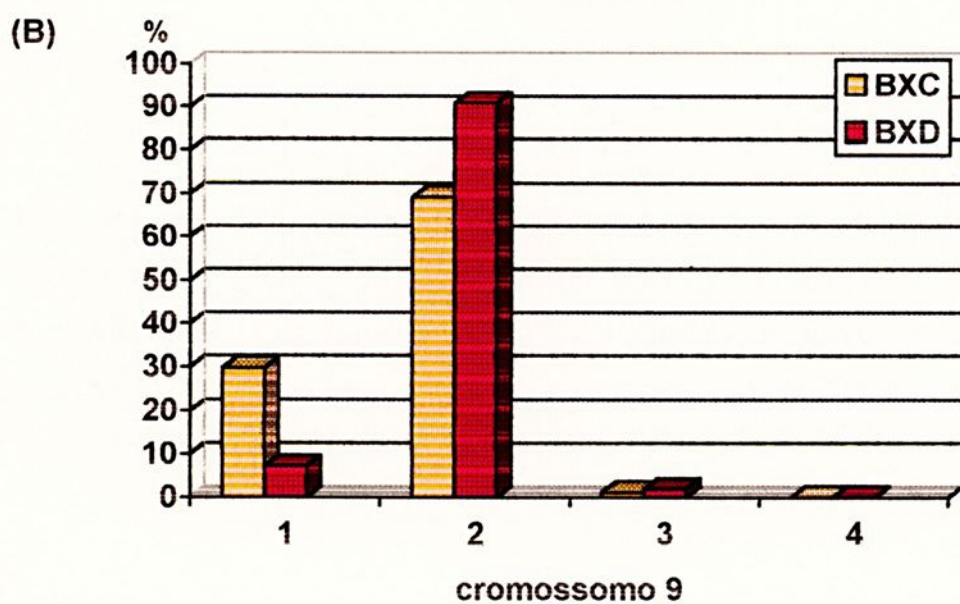
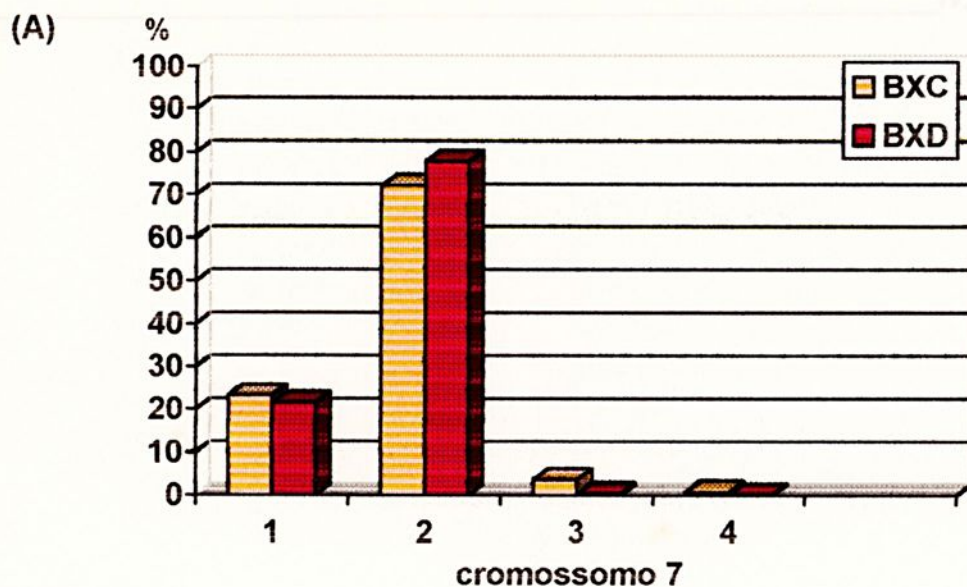


Figura 10

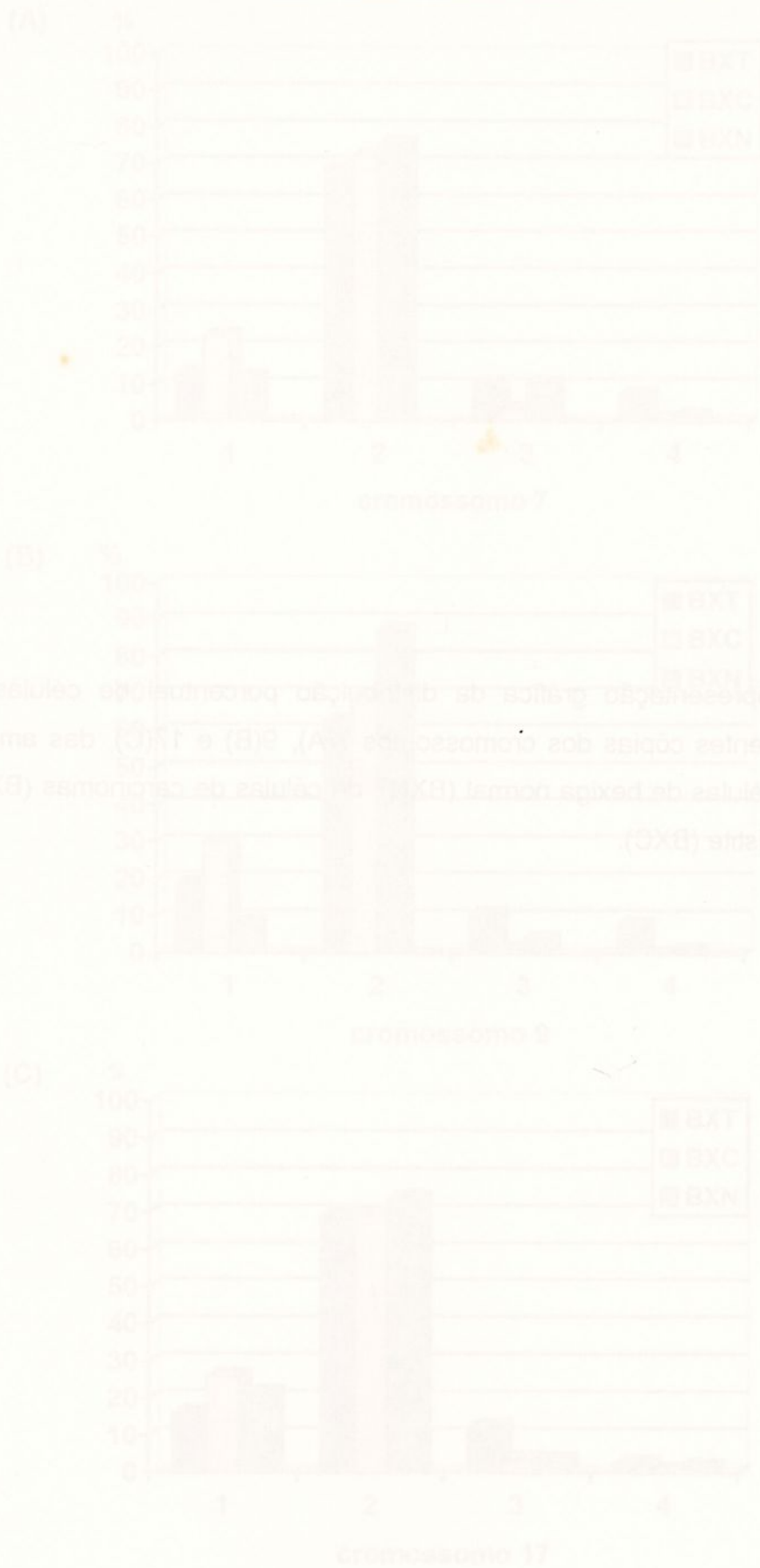
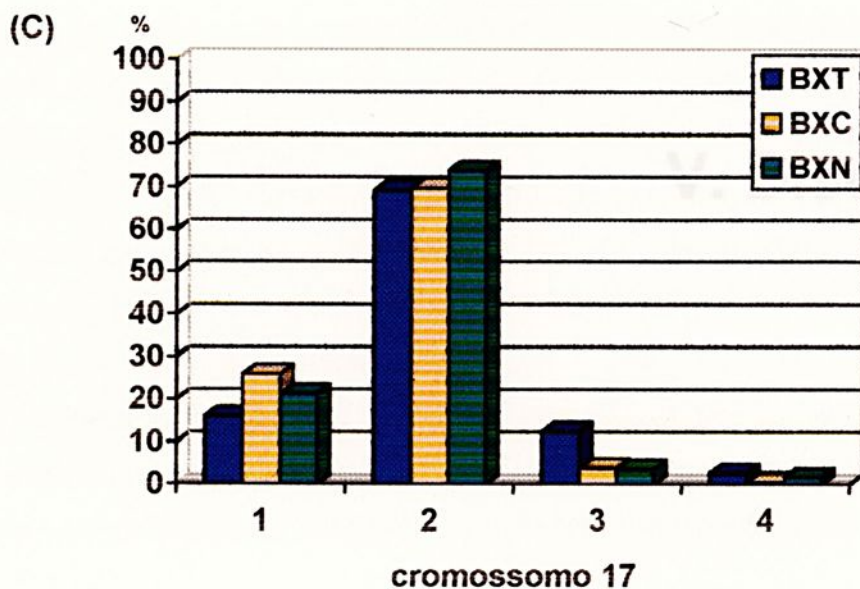
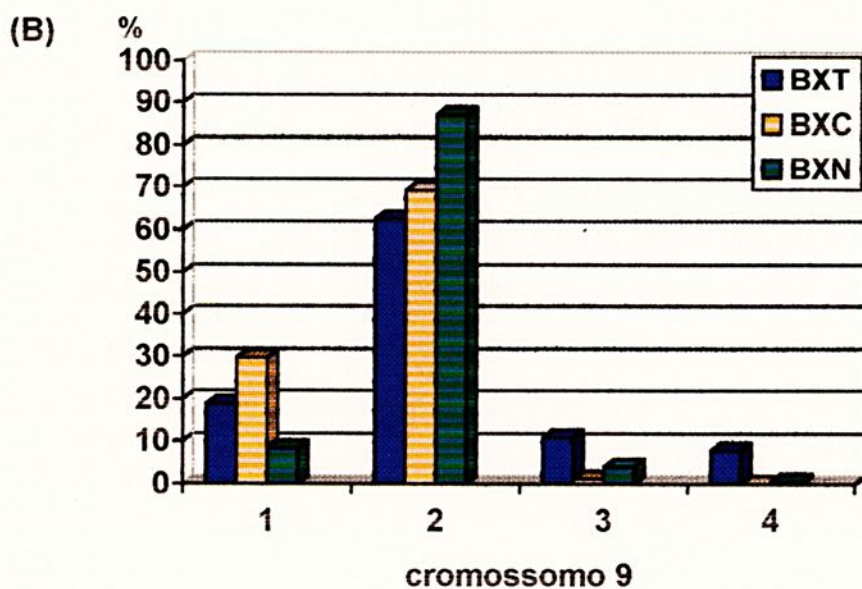
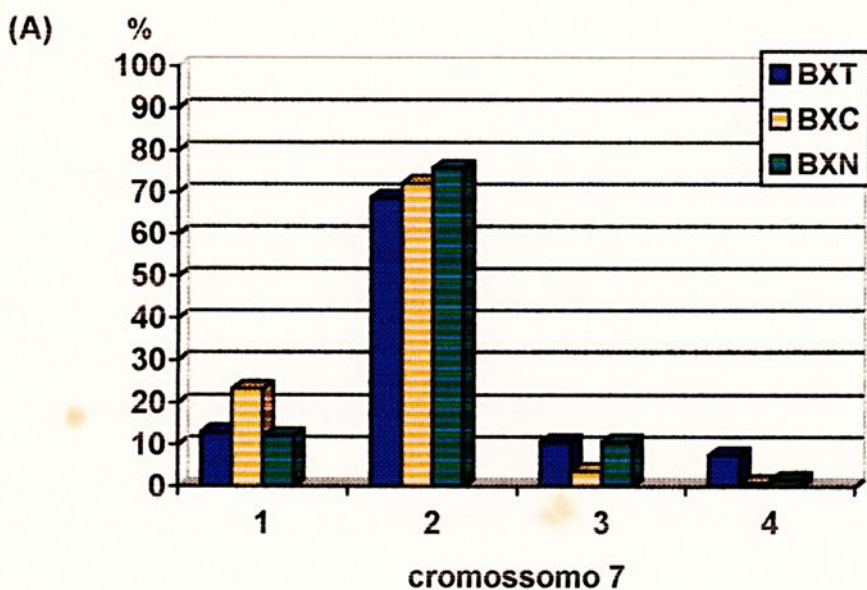


Figura 10

Figura 10. Representação gráfica da distribuição porcentual de células com diferentes cópias dos cromossomos 7(A), 9(B) e 17(C), das amostras de células de bexiga normal (BXN), de células de carcinomas (BXT) e de cistite (BXC).



V. Discussão

Nas últimas décadas ocorreram consideráveis avanços metodológicos para análises citogenética e molecular dos tumores, os quais puderam auxiliar no diagnóstico, prognóstico, tratamento e prevenção do câncer (Humprey *et al.*, 1998; Virmani *et al.*, 1998). Inicialmente a citogenética clássica evidenciou uma série de alterações características que ajudaram na diferenciação de subtipos de tumores, no entendimento da patogênese, assim como na descoberta de muitos genes envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose, de vários tipos de neoplasias (Humprey *et al.*, 1998). Dessa forma, as alterações detectadas em áreas específicas do genoma serviram como ponto de partida para investigações moleculares, propiciando o mapeamento de oncogenes e genes supressores de tumor, com papel importante no processo multipasso da carcinogênese.

A citogenética molecular, a partir da técnica FISH, que utiliza vários tipos de sondas de DNA, facilitou a identificação de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais, rearranjos cromossômicos complexos, cromossomos marcadores, diferenças no número de cópias gênicas e outras alterações, sendo amplamente utilizada em estudos populacionais na área de mutagênese, nos diagnósticos genético pré-natal e do câncer e diferentes áreas da pesquisa (Luke *et al.*, 1997).

A técnica FISH permitiu estudar diretamente a localização cromossômica de seqüências de DNA em núcleos interfásicos (citogenética interfásica) e preparações metafásicas, tanto de células cultivadas como de preparações frescas ou de material de arquivo da patologia. Dessa forma, tornou-se uma técnica rápida e sensível para detecção de heterogeneidade intratumoral quando comparada à citogenética clássica ou bandamento de alta resolução. Também ofereceu a vantagem de analisar um grande número de amostras obtidas por biópsias de tamanhos reduzidos e dispensando-se o cultivo celular (Virmani *et al.*, 1998). Além disso, a citogenética interfásica permite a comparação das aberrações cromossômicas, não apenas com o fenótipo histológico, mas também



com marcadores imunofenotípicos dos tumores, através de cortes histológicos que mantém a arquitetura do tecido tumoral (Ried *et al.*, 1998).

A iniciação e a progressão tumoral têm sido associadas com o acúmulo gradual de múltiplas alterações genéticas. Essas alterações envolvidas na carcinogênese surgem através de mecanismos que promovem perda ou ganho de material genético, como as deleções ou amplificações gênicas até mudanças no número de cromossomos (aneuploidias). Outra possibilidade é através da relocação de seqüências gênicas (aberrações estruturais) principalmente devido às translocações, que podem afetar genes próximos aos pontos de quebras resultando na desregulação de genes normais ou na formação de oncogenes quiméricos (Luke *et al.*, 1997).

Investigações sobre as atividades dos fatores iniciadores e promotores durante a progressão tumoral têm contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese da bexiga. A maioria dos tumores da bexiga são não-invasivos (estádio pTa), mas cerca de 30 a 40% apresentam invasão na época do diagnóstico inicial. A progressão desde tumores pouco invasivos (pT1) até altamente invasivos (pT2 e demais), segue conjuntamente com a aquisição de alterações genéticas, aumentando o potencial maligno do tumor (Richter *et al.*, 1998). Conforme Richter *et al.* (1998), a partir de resultados obtidos em seu estudo e outros trabalhos da literatura, alguns grupos de alterações cromossômicas podem estar associados com etapas específicas ao longo da progressão do câncer da bexiga. A partir do urotélio normal, as alterações mais freqüentes observadas nos tumores da bexiga considerando-se todos os graus e estadiamento, são a deleção 9p, o ganho 1q e as perdas do Y, devendo portanto, ocorrerem precocemente no desenvolvimento tumoral. Nos tumores papilares, as alterações mais características são a deleção 9q e o ganho da região 11q13 (ciclina D1), sugerindo um papel relevante de genes nessas regiões, para o crescimento dos tumores papilares. Existem evidências indicando regiões específicas do cromossomo 9 como responsáveis pelos tumores papilares superficiais de baixo grau, devido ao envolvimento de genes inibidores de ciclinas mapeados em 9p21 (De-Vita *et al.*, 1997). Outras alterações como 2q-, 8p-, 8q+,

9p-, 11p-, 11q-, 17q+ e 20q- podem ser encontradas em frequências similares tanto em carcinomas papilares como carcinomas sólidos invasivos, independente do nível de invasão, sendo algumas delas também freqüentes em carcinomas *in situ*. Essas alterações e as deleções 17p podem ser características de tumores da bexiga geneticamente instáveis, que são distintos dos tumores pTa de baixo grau. Já em carcinomas pT2-pT4 são observadas alterações em 5p+, 5q-, 6q-, 7p+, 15q- e Xq+, indicando que essas regiões podem conter genes com função na progressão tumoral. O acúmulo dessas alterações genéticas é importante, sendo que elas provavelmente atuam sinergisticamente. A maioria dos genes identificados nos tumores da bexiga, com envolvimento nos estádios tardios da progressão tumoral exercem função na regulação do ciclo celular e apoptose, como o *TP53*, a ciclina D1 e a *CDK4* (De-Vita *et al.*, 1997).

Os genes supressores de tumor e oncogenes que estão mais freqüentemente relacionados com o início e a progressão dos tumores da bexiga são *CDKN2*, *ARF*, *RB*, *TP53*, *BCL-2* e *c-ERBB-2*, assim como o *EGF* e seu receptor (*EGF-R*). A perda dos genes supressores de tumor *CDKN2* (*INK4A*) e *CDKN2B* (*INK4B*) localizados na região 9p21 é encontrada principalmente em tumores da bexiga em estágio inicial, indicando ser um evento precoce no desenvolvimento desse tipo tumoral (Aly *et al.*, 1999; Orlov *et al.*, 1999). A expressão elevada do *EGF-R* mapeado em 7p12, também é um evento inicial, associada principalmente pelas hiperploídias desse cromossomo (Waldman *et al.*, 1991; Kontogeorgos & Aninos, 1998; Aly *et al.*, 1999). Contrariamente, o supressor de tumor *TP53* (17p13.1) apresenta-se alterado em tumores de estágio avançado relacionando-se portanto, com a progressão tumoral e menor sobrevida do paciente (Cordon-Cardo *et al.*, 1992). Enquanto, o oncogene *c-ERBB-2* (9q21) encontra-se alterado freqüentemente em metástases nodais, refletindo o potencial maligno do tumor (Tarbin *et al.*, 1982; Moryiama *et al.*, 1991; Kontogeorgos & Aninos, 1998).

No presente estudo avaliou-se pela técnica FISH dezenove amostras de tecido da bexiga, constituídas por quatorze carcinomas, duas cistites crônicas inespecíficas após ressecção de CCT e três amostras de tecido

macroscopicamente normal da bexiga, oriundas de três dos pacientes com CCT. Como controle foram utilizados linfócitos cultivados e células de descamação da bexiga, ambos de indivíduos saudáveis, com o intuito de definir o tipo celular mais adequado para estabelecer as linhas de cortes para aneuploidias (monossomias, trissomias e tetrassomias).

Os linfócitos do sangue periférico pertencem a uma população de células que formam a linhagem linfóide do sistema imune. Eles desempenham um papel vital na defesa do organismo contra proteínas estranhas (antígenos) e reagem de diferentes formas após exposições a antígenos (Bender *et al.*, 1988). Basicamente existem dois tipos de linfócitos (B e T), que exercem funções diferentes no organismo. Eles adquirem receptores específicos para antígenos que lhes conferem especificidade durante todo o período de vida.

Os linfócitos são produzidos no timo e na medula óssea, numa quantidade de 10^9 células por dia num adulto saudável, representando cerca de 20% das células brancas (leucócitos) da circulação. Embora milhões de linfócitos sejam produzidos diariamente renovando o conjunto de células, muitas células linfóides possuem longa vida e podem persistir por muitos anos como células de memória. Estudos sobre danos cromossômicos induzidos por radiação, em linfócitos de indivíduos expostos à esse agente, indicam uma vida média de 3,5 anos. Entretanto, uma proporção dessas células pode manter-se na circulação sanguínea em estágio não-proliferativo e sobreviver durante muitas décadas (Bender *et al.*, 1988), ou ainda, terem um período de vida mais reduzido de quatro meses (Preston *et al.*, 1987). Assim, os linfócitos do sangue periférico constituem um ótimo sistema para estudos citogenéticos, pois além de ser um tipo celular facilmente acessível e em grande número (1 milhão/mL de sangue periférico), circulam por todos os tecidos do corpo, podendo ser considerados como monitores internos não específicos de um órgão (Bender *et al.*, 1988).

Os linfócitos do sangue periférico em estágio de repouso (G_0) ao serem colocados em cultura, na presença de fito-hemaglutinina (PHA) são estimulados e sintetizam RNA, proteínas e DNA. Após cerca de 48 horas a maioria está em sua primeira mitose. Portanto, são utilizados para o monitoramento de populações

expostas a drogas, seja por razões profissionais, terapêuticas ou acidentais (Natarajan & Obe, 1980). Supondo-se que haja uma correlação entre o dano induzido no sangue e em outras células somáticas, os linfócitos serviriam como um sistema sentinela para estudos em grupos de alto risco (Nordenson *et al.*, 1984).

As células de descamação da bexiga também são freqüentemente utilizadas em testes de mutagenicidade, principalmente testes de micronúcleos, nesse caso não sendo aconselhável a utilização de células de indivíduos do sexo feminino, pois pode ocorrer contaminação com células da vagina. Essas células podem ser obtidas facilmente após centrifugação da urina (Rabello-Gay, 1991). As células encontradas presentes na urina são oriundas do epitélio de revestimento urotelial, que permaneceram em contato com metabólitos contidos na urina. No presente estudo, foram utilizadas células de descamação da bexiga de cinco indivíduos jovens (15-27 anos), cujo urotélio foi exposto a possíveis agentes ambientais durante um menor período de anos em relação aos indivíduos do grupo com lesões da bexiga, que encontravam-se em uma faixa etária maior (52-83 anos). Foram realizados testes com urina de crianças (6-8 anos), cuja exposição a possíveis carcinógenos é ainda menor, entretanto, não foi possível obter um número suficiente de células para análise pela técnica FISH.

A análise estatística entre as amostras de linfócitos e descamação da bexiga revelou diferenças significantes entre as distribuições de células com diferentes números de sinais dos cromossomos 7 e 9. Assim, utilizou-se como controle os resultados obtidos em células de descamação da bexiga, por constituir o mesmo tipo de tecido das amostras tumorais e por ser freqüentemente utilizado como controle em estudos citogenéticos para comparação com os tumores da bexiga (Yokogi *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1997; Bartlett *et al.*, 1998; Mahdy *et al.*, 1999). Uma vantagem de que, no estudo ora realizado, estas células foram obtidas através da urina, consistindo numa metodologia simples e não invasiva para os indivíduos. Enquanto que nos demais estudos, a obtenção de células uroteliais normais foi através de lavado vesical (Sauter *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1997; Reeder *et al.*, 1998) e material fixado em formalina ou embocado em

parafina (Ghaleb *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1997; Bartlett *et al.*, 1998). Ainda, outros trabalhos, apesar de também utilizarem urotélio normal como controle, não relataram como obtiveram esse material (Wagner *et al.*, 1995; Aly *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1999; Mahdy *et al.*, 1999; Neuhaus *et al.*, 1999). A utilização de tecido normal da bexiga a partir de material de arquivo emblocado em parafina também é uma fonte interessante para obtenção de amostras controles. Contudo, como a técnica FISH, no grupo experimental do presente estudo, foi realizada em material fresco, os resultados obtidos em material parafinado, provavelmente não seriam os mais adequados, devido diferenças metodológicas durante o processamento das amostras e eficiência de hibridação das sondas. Assim, concluindo-se que as células de descamação da bexiga obtidas pela sedimentação da urina constituem um sistema adequado para análise.

No presente trabalho, a partir de núcleos isolados de material fresco de lesões da bexiga malignas e benignas e tecido normal da bexiga observou-se anomalias numéricas dos cromossomos 7, 9 e 17. De modo geral, as anomalias mais freqüentes foram as trissomias 7 e 17 e monossomia 9.

A cascata de alterações cromossômicas que ocorre durante o desenvolvimento tumoral da bexiga inicia-se mais comumente com a perda parcial ou total do cromossomo 9, devendo ser um evento precoce no desenvolvimento e progressão tumoral (Ghaleb *et al.*, 1996; Yokogi *et al.*, 1996; Balázs *et al.*, 1997; Richter *et al.*, 1997; Bartlett *et al.*, 1998; Fadi-Elmula *et al.*, 1998; Pycha *et al.*, 1998; Aly *et al.*, 1999; Madhy *et al.*, 1999). Essas alterações consistem principalmente de deleções 9q em tumores no estágio pTa, seguida de deleções 9p, encontrada mais freqüentemente a partir do estágio pT1 (Bruch *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1998). Nessas regiões cromossômicas encontram-se genes que desempenham papel importante no controle da proliferação celular. Assim, distúrbios na função desses genes ou em associação com outros genes podem contribuir para a iniciação do desenvolvimento do câncer da bexiga. Dentre os possíveis genes destacam-se os supressores tumorais inibidores de quinases dependentes de ciclina, como o *CDKN2*, (*MTS1*, *INK4A*, p16), *CDKN2B* (*MTS2*, *INK4B*, p15) e *IFNA*, mapeados em 9p21 e

frequentemente encontrados deletados em tumores vesicais (Balázs *et al.*, 1997; Orlow *et al.*, 1999). Além dos tumores da bexiga, o gene *CDKN2* apresenta mutações e deleções em frequência elevada também em gliomas, melanomas e leucemias (Balázs *et al.*, 1997). Balázs *et al.* (1997) observaram deleção em homozigose do gene *CDKN2* em 30% dos tumores superficiais da bexiga nos estádios pTa e pT1, corroborando ser esse, um evento precoce no desenvolvimento em tumores de baixo estadiamento. Deleções do gene *INK4A* também foram observadas em 14,1% dos carcinomas de células transicionais e mutações de ponto em 3%, evidenciando sua contribuição na origem deste tipo tumoral (Orlow *et al.*, 1999). Habuchi *et al.* (1995) sugeriram um outro gene supressor de tumor localizado em 9q34, uma região frequentemente deletada em tumor da bexiga e outras neoplasias.

Segundo Bartlett *et al.* (1998), a perda do cromossomo 9 em pacientes com CCT está associada com risco elevado de recorrência tumoral, sugerindo existência de genes relacionados à recidivas nesse cromossomo. Assim a detecção dessa alteração em estádios precoces pode ser utilizada como um possível marcador de recorrência da doença.

No presente estudo, a monossomia do cromossomo 9 não ocorreu como evento isolado, mas foi observada em associação com outras anomalias em 28,5% (4/14) das amostras de carcinomas e nas duas amostras de cistite. Esta frequência baixa pode ter sido devido a utilização da sonda satélite clássica do cromossomo 9 que não é adequada para detecção de perdas parciais desse cromossomo. Linn *et al.* (1998) também obtiveram frequências reduzidas de monossomia 9 utilizando sonda centromérica. De modo geral, alguns estudos têm relatado frequências de monossomia 9 em cerca de 50-60% das neoplasias da bexiga (Pycha *et al.*, 1998; Aiy *et al.*, 1999). Interessantemente, Hartmann *et al.* (1999) observaram perdas do cromossomo 9 em 70% das amostras de hiperplasia urotelial, em pacientes com carcinoma papilar da bexiga também com a mesma alteração, corroborando a hipótese de que anomalias desse cromossomo são eventos precoces no desenvolvimento dessa neoplasia. Ainda nesse estudo, os autores detectaram alterações do cromossomo 9 em 50% (6/12) das amostras

microdissecadas de urotélio diagnosticado histopatologicamente como normal de pacientes com tumor da bexiga. Assim, alterações genéticas similares aos tumores foram encontradas tanto nas hiperplasias como no urotélio normal dos pacientes.

Das seis amostras que apresentaram monossomia 9, no presente estudo, duas eram CCT de grau I (BXT04 e BXT05) e duas eram cistites (BXC01 e BXC02). Apenas um tumor era de grau II (BXT08) e outro de grau IV (BXT12), corroborando a hipótese de que esta é uma alteração inicial. Apesar de Aly *et al.* (1999) correlacionarem perdas do cromossomo 9 com pacientes mais jovens, tumores de baixo grau e não envolvimento de linfonodos pélvicos pela doença, Simon *et al.* (1998) verificaram que a frequência de anomalias nos tumores da bexiga, incluindo alterações do cromossomo 9 não estava associada com o grau do tumor, mas particularmente com o estágio. Os tumores pT1 (invasivos) apresentaram taxas maiores de aberrações por tumor que os pTa (não-invasivos), corroborando os achados descritos por Sauter *et al.* (1998) e evidenciando um maior grau de instabilidade genética nos tumores pT1.

Em cistites são escassos os resultados de estudos genéticos. Todavia, Ghaleb *et al.* (1996) observaram monossomia 9 em amostras de cistite de pacientes com esquistossomose, que progrediram para tumor da bexiga. Os autores sugeriram que a monossomia 9 também constitui uma alteração inicial no urotélio da bexiga infestado por bilharzia e é indicadora de carcinoma incipiente em pacientes com cistite esquistossomótica. Todavia, essa alteração não foi observada na mucosa benigna desses pacientes.

No presente estudo, cinco amostras de CCT (BXT07, BXT09, BXT11, BXT13 e BXT14) e uma amostra de bexiga normal (BXN01) apresentaram polissomia 9. Na maioria dessas lesões, tal alteração estava associada com polissomias dos cromossomos 7 e 17, sugerindo tratar-se de tumores com populações de células hiperdiplóides ou poliplóides. A polissomia do cromossomo 9 constitui um evento raro no processo da tumorigênese urotelial, mas também foi relatada em neoplasias da bexiga por outros autores (Ghaleb *et al.*, 1996; Pycha *et al.*, 1998; Mahdy *et al.*, 1999), contudo, sem informações sobre seu possível

envolvimento no processo carcinogênico, devendo tratar-se de instabilidade genética.

A trissomia 7 foi o achado mais comum nas amostras analisadas, ocorrendo em 85,7%(12/14) dos carcinomas de células transicionais e carcinoma anaplásico indiferenciado, nas duas amostras de cistites crônicas e nas três amostras de mucosa da bexiga macroscopicamente normal. Essa alteração juntamente com a monossomia 9, tem sido considerada como aberração cromossômica primária do câncer de bexiga (Yokogi *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 1998; Fadl-Elmula *et al.*, 1998; Pycha *et al.*, 1998; Aly *et al.*, 1999). Pycha *et al.* (1998) detectaram freqüências elevadas de trissomia 7 tanto em amostras de carcinomas de células escamosas (79%) como de células transicionais (93,2%), sendo que em pelo menos 79% dos casos, tanto a trissomia como a polissomia 7 estavam correlacionadas com tumores de estágio avançado, corroborando outros relatos de que esse evento está associado com a progressão das lesões de baixo para alto grau e carcinomas invasivos, como também com maior risco de recorrência (Yokogi *et al.*, 1996; Bartlett *et al.*, 1998; Ried *et al.*, 1998).

A trissomia 7 parece ser uma anormalidade primária em uma grande variedade de tipos tumorais além da bexiga, como estômago, rim, cérebro, colon, pulmão, ovário, próstata, tireóide e melanoma (Johansson *et al.*, 1993; Dalessandro *et al.*, 1997; Hugson *et al.*, 1998; Barril *et al.*, 1999). Essa trissomia também foi descrita em lesões não neoplásicas como placas ateroscleróticas, sinovite reumatóide, artrite reumatóide, pielonefrite crônica e osteatose hepática (Johansson *et al.*, 1993; Roca *et al.*, 1998). Alguns estudos clínicos têm postulado uma relação entre processo inflamatório e câncer, contudo não está esclarecido se o sítio com inflamação crônica também resulta de alterações genéticas (Pycha *et al.*, 1998). Assim, a trissomia 7 não pode ser considerada como alteração específica de tumores.

O presente estudo evidenciou trissomia 7 nas duas amostras de cistite crônica inespecífica e nas três amostras de bexiga macroscopicamente normais, corroborando a hipótese dessa alteração ocorrer como um evento inicial na carcinogênese da bexiga. As duas amostras de cistites, embora sejam lesões

benignas, foram ressecadas de pacientes com história de CCT anterior. Na amostra BXC01 a cistite ocorreu após um ano e seis meses da ressecção de um CCT invasivo grau III. Neste caso além da trissomia 7, detectou-se tetrassomia 7, monossomia 9 e tetrassomia 17. O caso BXC02 correspondeu a uma cistite removida após a ocorrência de duas recidivas de CCT graus I e III, com intervalos de tempo de dois e quatro meses, respectivamente. Este caso apresentou adicionalmente monossomia 9. Portanto, as anomalias numéricas observadas nestas amostras são compatíveis com a evolução clínica desses pacientes. Por outro lado, não pode-se inferir que esses tipos de alterações sejam característicos naqueles casos de cistite crônica devido outras causas não associadas à processos neoplásicos.

As amostras de células de descamação da bexiga de indivíduos jovens saudáveis, do presente estudo, não mostraram trissomia 7, quando utilizou-se como parâmetro as frequências de núcleos com três sinais desse cromossomo, obtidas de linfócitos cultivados. Portanto, o urotélio normal da bexiga de indivíduos jovens e saudáveis não apresenta caracteristicamente essa alteração, assim como outros tipos de tecidos normais como a tireóide (Barril *et al.*, 1999; Roque *et al.*, 1999). Barril *et al.* (1999) avaliando 10 amostras de tireóide normal obtidas de autópsia, cuja causa da morte não estava associada a doenças dessa glândula, não detectaram anomalias numéricas dos cromossomos 7, 10 e 17. Do mesmo modo Roque *et al.* (1999) não observaram alterações numéricas dos cromossomos 7 e 12 em tecido tireoideano normal. Portanto, a presença dessa trissomia em lesões benignas ou tumores malignos da bexiga, deve ter um papel significativo durante o processo carcinogênico.

As trissomias e/ou tetrassomias 7 observadas nas três amostras de bexiga macroscopicamente normal, obtidas de uma região distante durante a ressecção de carcinomas de células transicionais, também estavam presentes nos respectivos tumores, além de outras alterações que serão discutidas brevemente. Em outros tecidos macroscopicamente normais como pulmão, mama, cérebro e rim têm-se relatos de trissomia 7. Também, nesses casos os tecidos normais foram obtidos de áreas adjacentes ou não aos respectivos tumores. Todavia, na

maioria dos casos em que tanto a amostra normal como tumoral foram analisadas, a trissomia 7 não consistia numa alteração característica do tecido tumoral, indicando que as células normais não eram oriundas de células tumorais infiltrativas (Johansson *et al.*, 1993). Em urotélio considerado hiperplásico, em pacientes com câncer da bexiga, Chatuverdi *et al.* (1997) e Hartmann *et al.* (1999) observaram a ocorrência de algumas alterações nos cromossomos 9 e 17. Segundo esses autores, muitas áreas da bexiga de pacientes com carcinoma urotelial são geneticamente alteradas. Portanto, investigações genéticas através de biópsias do urotélio normal de áreas com diferentes aspectos histológicos, em pacientes com câncer da bexiga, podem fornecer informações sobre as primeiras etapas da carcinogênese desse órgão (Hartmann *et al.*, 1999). Estes resultados também evidenciam que o urotélio normal de pacientes com história de tumor vesical, não constituem uma amostra adequada para ser utilizada como controle em estudos genéticos.

O significado da trissomia 7 em tecidos normais e tumorais ainda não está esclarecido, contudo Huebner *et al.* (1989) propuseram que essa alteração poderia conferir uma vantagem proliferativa e/ou representaria uma alteração genética somática de uma linhagem específica que ocorreria durante e levaria a diferenciação de um determinado tipo celular. Assim, a trissomia 7 poderia ser uma alteração necessária para a diferenciação de vários tipos celulares no corpo ou em órgãos específicos.

No cromossomo 7 estão mapeados alguns genes como o receptor do fator de crescimento epidérmico (*ERBB*), relacionado com a regulação da proliferação celular. A expressão elevada desse receptor em carcinomas de células transicionais da bexiga tem sido associada com progressão neoplásica e com o tempo e número de recorrências tumorais (Kontogeorgos & Aninos, 1998). Portanto, as polissomias do cromossomo 7, verificadas no presente estudo, podem estar associadas com uma divisão descontrolada e progressão maligna, sugerindo-se um acompanhamento clínico mais rigoroso dos pacientes.

Das quatorze amostras de tumores malignos da bexiga (BXT) a polissomia 7 foi observada como evento único em três delas (21,4%) e em duas amostras de

bexiga normal. Esse evento também estava associado com aneuploidias do cromossomo 9 em duas amostras BXT (14,3%) e uma BXC, e do cromossomo 17, em uma amostra BXT. Todavia, mais freqüentemente foram observadas aneuploidias envolvendo os três cromossomos, ou seja, 42,8% das amostras de BXT (6/14), uma das amostras de cistite e outra de bexiga normal.

Quanto as anomalias do cromossomo 17, no presente estudo foram observadas polissomias (trissomia e/ou tetrassomia) em 57,1% (8/14) dos carcinomas, em uma amostra de cistite e na amostra de bexiga normal (BXN01), que apresentou as mesmas alterações do tumor correspondente (BXT13). A polissomia 17 foi encontrada sempre em associação com outras aneuploidias dos cromossomos 7 e 9. Esse evento é um achado freqüente em tumores da bexiga juntamente com outras anomalias, principalmente dos cromossomos 7 e 9, indicando sua participação como um evento mais tardio da carcinogênese da bexiga, relacionada com estádios mais avançados e de alto grau, durante a progressão tumoral (Sauter *et al.*, 1995 a, b; Ghaleb *et al.*, 1996; Yokogi *et al.*, 1996; Linn *et al.*, 1998; Pycha *et al.*, 1998; Mahdy *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1999; Neuhaus *et al.*, 1999).

Neste estudo, a polissomia 17 foi observada em alguns tumores de baixo grau (I) e em todos tumores de graus avançados (II a IV). Entretanto, os tumores de grau I (BXT03 e BXT05) correspondiam respectivamente, a quarta e terceira recidivas, de tumores de graus mais avançados. Todos os tumores de graus III e IV (BXT11 a BXT14), com trissomia ou tetrassomia desse cromossomo também tinham história de recidivas anteriores. Neuhaus *et al.* (1999) relacionaram essa alteração com risco elevado de recorrência e progressão tumoral, corroborando outros estudos (Sauter *et al.*, 1995; Yokogi *et al.*, 1996; Linn *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1998) que associaram a polissomia 17 com tumores invasivos e de estágio avançado. Em cistite esquistossomótica, hiperplasia e urotélio normal da bexiga, também há relatos de polissomia 17, contudo, nesses casos as biópsias foram colhidas de pacientes que tinham desenvolvido câncer da bexiga (Ghaleb *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1999).

Estudos moleculares pela técnica HGC em neoplasias da bexiga, têm indicado perdas da região 17p (17p13) e ganho da região 17q (17q11 a 17q25) (Hovey *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1998; Mahdy *et al.*, 1999). Essas regiões abrigam o gene supressor de tumor *TP53* (17p13.1), importante na parada do ciclo celular na fase G1-S e o oncogene *c-ERBB-2* (17q21), que codifica a proteína p185, um receptor tirosina quinase (fosfoglicoprotéico transmembrânico) com potencial carcinogênico, indicando que alterações nesses genes são eventos relevantes na transformação maligna do urotélio vesical (Wagner *et al.*, 1995).

Estudos imunoistoquímicos e moleculares têm evidenciado respectivamente, acúmulo da proteína p53 e mutações desse gene em tumores da bexiga de grau e estágio avançados. Assim, mutações no gene *TP53* têm envolvimento importante na progressão do câncer de bexiga superficial para invasivo (Sauter *et al.*, 1995b; Wagner *et al.*, 1995; Linn *et al.*, 1998; Pycha *et al.*, 1998). Sauter *et al.* (1995b) analisando 138 carcinomas de células transicionais, pela técnica FISH constataram aneuploidias (monossomia ou trissomia) do cromossomo 17 em 62% dos casos. A ocorrência dessas alterações estava associada com um fenótipo histopatológico maligno, grau e estágio tumoral e presença de alterações no gene *TP53*. Aneuploidias do cromossomo 17 foram observadas em 97% dos tumores com ocorrência simultânea de deleção do gene e expressão aumentada da proteína p53. Esses dados indicam heterogeneidade do número de cópias do cromossomo 17 associada com deleção e super expressão da proteína p53. Investigações do gene *c-ERBB-2*, nesse tipo tumoral, têm evidenciado amplificação, freqüentemente associada com recorrência e metástases (Sauter *et al.*, 1995b; Wagner *et al.*, 1995; Kontogeorgos & Aninos 1998). A proteína p185 pode ser utilizada através de imunocoloração, no monitoramento citológico de pacientes com risco de desenvolver câncer da bexiga, atuando como um marcador tumoral (Kontogeorgos & Aninos, 1998).

Os achados citogenéticos, indicaram heterogeneidade genética intra-tumoral na maioria dos carcinomas avaliados, assim como nas amostras de cistite e bexiga normal. Esta heterogeneidade foi evidenciada pela presença de

aneussomias dos cromossomos 7, 9 e 17, definida como a ocorrência de pelo menos dois tipos diferentes de anomalias numéricas ocorrendo na mesma amostra (Yokogi *et al.*, 1996).

A heterogeneidade intra-tumoral é um fenômeno bem estabelecido em câncer da bexiga e outros tumores sólidos (Sauter *et al.*, 1995b; Yokogi *et al.*, 1996). Esta heterogeneidade é freqüentemente observada na morfologia e proliferação celular, e na expressão de proteínas celulares como antígenos de grupos sanguíneos ou produtos de oncogenes e genes supressores de tumor (Sauter *et al.*, 1995b). Assim, supondo-se também que as alterações genéticas sejam heterogêneas nas células tumorais. Hipoteticamente, a heterogeneidade genética tumoral seria o resultado de falhas dos mecanismos existentes para assegurarem a estabilidade genética, como as paradas do ciclo celular, envolvidas na preservação da integridade genética, como a controlada principalmente pelo gene *TP53* (Sauter *et al.*, 1995b).

O mecanismo de formação de múltiplas populações aneussômicas pode ocorrer de diferentes modos. Em alguns casos, pode surgir continuamente de uma linhagem celular através do processo de não-disjunção ou outros distúrbios durante a duplicação. Em outros, pode representar linhagens celulares distintas com propriedades biológicas diferentes. Assim, populações aneussômicas podem ser derivadas de outras pela aquisição de uma alteração gênica crítica resultando em uma vantagem proliferativa (Sauter *et al.*, 1995b). Baseado no modelo multipasso da progressão tumoral, a ocorrência de instabilidade genética é um evento relevante na carcinogênese e pode ser uma característica clinicamente importante do tumor, associada com um fenótipo histopatologicamente maligno (Sauter *et al.*, 1995b; Yokogi *et al.*, 1996). De modo geral, alguns estudos relatam que a presença de populações aneussômicas está associada com prognóstico ruim tanto nos tumores como em lesões pré-cancerosas da bexiga (Gustafson *et al.*, 1982; De Vere *et al.*, 1988; Al Abadi *et al.*, 1994)).

Heterogeneidade genética intra-tumoral foi constatada em dez amostras (71,4%) dos carcinomas (BXT03, BXT04, BXT05, BXT07, BXT08, BXT09, BXT11, BXT12, BXT13 e BXT14), nas duas amostras de cistite (BXC01 e BXC02) e em

duas amostras de bexiga normal (BXN01 e BXN02). Os tumores BXT03 e BXT05, que apresentaram trissomias e tetrassomias dos cromossomos 7 e/ou 17, apesar de serem grau I, correspondem a quarta e terceira recidivas, respectivamente de tumores de graus I e II, onde deve ter ocorrido um acúmulo de alterações genéticas. O caso BXT04, de grau I, é um tumor primário, com trissomia e tetrassomia 17, com potencial para progressão e recorrência tumoral, que são características dessa alteração cromossômica, conforme relatado por alguns autores (Sauter *et al.*, 1995b; Pycha *et al.*, 1998; Yokogi *et al.*, 1998), devendo portanto, ter um acompanhamento clínico rigoroso.

Os casos BXT07, BXT08 e BXT09 de grau II, são tumores mais avançados, sendo que o BXT08 já apresentava invasão da lâmina própria e o BXT09 era a quarta recidiva de tumores de graus I, II, II, IV, todos invasivos. Os casos BXT11 à BXT14 são de graus III e IV altamente invasivos, com um acúmulo de alterações indicando instabilidade genética. Sauter *et al.* (1998) observaram que uma das diferenças entre os tumores não invasivos e invasivos da bexiga incluía a ocorrência de instabilidade genética nos tumores invasivos. Similarmente, Hartmann *et al.* (1999) obtiveram um aumento de 50% na taxa de alterações genéticas nos tumores papilares em relação às hiperplasias, sugerindo um acúmulo de alterações com a progressão da lesão.

Das duas amostras de cistite crônica estudadas, o caso BXC01 com história de um CCT papilífero grau III invasivo anterior, apresentou trissomia e tetrassomia do cromossomo 7, além de monossomia 9 e polissomia 17. No outro caso (BXC02), a cistite crônica ocorreu após progressão de uma cistite cística para CCT papilífero grau III invasivo com recorrência de um CCT grau II. Nesse caso observou-se apenas trissomia 7 e monossomia 9.

As amostras de bexiga macroscopicamente normal também apresentaram heterogeneidade intra-tumoral. O caso BXN01 apresentou as mesmas alterações genéticas do respectivo tumor (BXT13), provavelmente por ser um tumor de alto grau, altamente invasivo e necrótico. O paciente teve a bexiga inteira retirada na cirurgia devido ao comprometimento do órgão pelo tumor. O caso BXN02 proveniente de paciente com CCT grau I (BXT04), apresentou trissomia e

tetrassomia 7, representando alterações genéticas iniciais da carcinogênese da bexiga e a amostra BXN03, proveniente do caso BXT07, um CCT grau II, apresentou apenas trissomia 7. Alguns aspectos característicos dos tumores da bexiga são as recorrências freqüentes e uma tendência para a multicentricidade, sugerindo que o câncer da bexiga é uma doença de campo envolvendo o urotélio como um todo. Assim, alterações do urotélio distante do tumor, semelhantes às encontradas no tecido tumoral, podem ser altamente relevantes para o prognóstico do paciente (Wagner *et al.*, 1995). Portanto, os pacientes referentes as amostras BXT04 e BXT07, em que observou-se anomalias genéticas no urotélio normal, têm risco elevado de recorrências, com exceção do paciente BXT13, que já ressecou toda bexiga. Como já discutido anteriormente, o urotélio macro e histologicamente normal de pacientes com câncer da bexiga pode conter alterações genéticas relevantes no processo de iniciação da transformação maligna, não consistindo portanto, um tipo adequado de tecido para ser utilizado como controle em estudos genéticos.

Comparando-se os resultados obtidos entre as amostras de CCT de baixo e alto grau, na tentativa de relacionar as alterações observadas com a histopatologia, pode-se verificar um acúmulo de aneuploidias nos tumores de graus mais elevados III e IV (BXT11 a BXT14), que apresentaram múltiplas alterações envolvendo os cromossomos 7, 9 e 17, em relação aos tumores de graus I e II (BXT01 a BXT10). O caso BXT02 não apresentou alteração quanto aos cromossomos avaliados, apesar de ser a primeira recidiva de um CCT grau II, e os casos BXT01, BXT06 e BXT10 apresentaram apenas trissomia 7. A amostra BXT01 correspondia ao tumor primário, porém as amostras BXT06 e BXT10 têm história de duas recidivas anteriores. Os casos BXT03, BXT04 e BXT05, de grau I, apresentaram aneussomias dos cromossomos 7 e/ou 17, sendo que os casos BXT03 e BXT04 tratavam-se respectivamente de quarta e terceira recidivas, enquanto o caso BXT04 foi procedente de um tumor primário. Trissomia e tetrassomia 17 estão associadas à recorrências e progressão tumoral, portanto configurando casos interessantes para serem acompanhados clinicamente.

Dos tumores de grau II que apresentaram trissomia 7 associada com alterações dos cromossomos 9 e 17 (BXT07, BXT08 e BXT09), apenas o caso BXT07 era um tumor primário. O BXT08 apresentava invasão da lâmina própria e o BXT09 era a quarta recidiva, sendo também indicados para o acompanhamento clínico.

Os tumores de alto grau (BXT11 a BXT14), todos primários e altamente invasivos (músculo e linfonodos) apresentaram freqüentemente trissomia e tetrassomia dos cromossomos 7, 9 e 17, corroborando estudos anteriores (Sauter *et al.*, 1995b; Sauter *et al.*, 1998; Yokogi *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 1999), que observaram a ocorrência dessas alterações em tumores avançados com prognóstico pobre. Especialmente os casos BXT13 e BXT14 apresentaram polissomias dos cromossomos 7, 9 e 17 em freqüências elevadas. Estes dados juntamente com o tamanho nuclear aumentado, constatado durante a análise citogenética, sugeriram a ocorrência de células tumorais hiperdiploides ou mais provavelmente poliploides (4n). Apesar da técnica FISH não permitir a diferenciação precisa entre esses dois eventos e também não ser uma técnica adequada para confirmar poliploidia, quando realizou-se a hibridação simultânea com as sondas dos cromossomos 7 e 9 marcadas com fluorocromos diferentes, constatou-se uma porcentagem elevada de núcleos apresentando simultaneamente tetrassomia para os dois cromossomos. Dessa forma reforçando a possibilidade de tratar-se de tumores com populações celulares tetraploides. Outros estudos também relataram a ocorrência de células poliploides, como um evento freqüente em CCT invasivos (Sauter *et al.*, 1995a; Kontogeorgos & Aninos, 1998). Essas alterações são consistentes com o modelo de progressão tumoral, em que a poliploidização ocorre como um evento tardio da carcinogênese.

Conforme os resultados obtidos pode-se observar que houve uma progressão na seqüência de anomalias numéricas nos tumores de graus I a IV. A trissomia 7 e a monossomia do cromossomo 9 foram os eventos iniciais, esse último aparecendo com maior freqüência nos tumores de graus I e II e nas cistites. A trissomia 7 associada a tetrassomia permaneceu nos tumores de graus mais elevados, constituindo a alteração numérica mais freqüente. Enquanto, que

as perdas do cromossomo 9, tiveram uma frequência menor, neste estudo. Os tumores de graus III e IV, e aqueles de graus I e II recidivantes, apresentaram caracteristicamente polissomias 7, 9 e 17, freqüentes em tumores avançados. Estes achados confirmam a evolução das alterações numéricas implicadas na carcinogênese urotelial, assim como a ocorrência de heterogeneidade genética intratumoral, evidenciando instabilidade genética, um dos mecanismos chaves para a progressão tumoral. Portanto, a técnica FISH, como uma ferramenta para a quantificação de heterogeneidade tumoral, pode trazer informações relevantes para o acompanhamento clínico e escolha de tratamentos específicos para os pacientes. Mais importante ainda seria o diagnóstico precoce do tumor e a detecção de recorrências, através de marcadores genéticos em urotélio ainda considerado histologicamente normal e em biópsias de lesões benignas como cistite, hiperplasias e displasias, ou em células de descamação da bexiga, presentes na urina de pacientes com risco de desenvolver tal neoplasia.

VI. CONCLUSÕES

VI. Conclusões

- Os resultados obtidos através deste trabalho indicam a participação dos cromossomos 7, 9 e 17 na progressão de iniciação e progressão tumoral da bexiga, sendo concordantes com a literatura.
- De modo geral, houve uma associação entre os tipos de aneuploidias numéricas e a gravidade tumoral, sendo a trissomia 7 e a monossomia 9 mais comuns nos tumores de graus I e II e nas células, enquanto que nos tumores de graus III e IV invasivos ocorreram principalmente polissomias dos cromossomos 7, 9 e 17 e poliploidias.
- Estes cromossomos podem ser utilizados nos estudos citogenéticos como marcadores cromossômicos, tanto para o diagnóstico precoce como para o acompanhamento clínico dos pacientes com tumores da bexiga.
- Lesão benigna da bexiga como citite crônica e o urotélio normal da bexiga de pacientes com tumores podem conter alterações cromossômicas importantes relacionadas à progressão tumoral e risco elevado de recorrências.
- O urotélio normal de pacientes com câncer da bexiga não consiste, portanto, um tipo celular adequado para ser utilizado como controle em estudos genéticos, mas pode indicar a ocorrência de alterações envolvidas na carcinogênese desse órgão.

VI. CONCLUSÕES

- As células do urotélio da bexiga de indivíduos jovens e saudáveis obtidas após lavagem de urina constituem um sistema simples e não-invasivo para investigações cromossômicas pela técnica FISH.

VI. Conclusões

- a. Os resultados obtidos através deste trabalho indicam a participação dos cromossomos 7, 9 e 17 nos processos de iniciação e progressão tumoral da bexiga, sendo concordantes com a literatura;
- b. De modo geral, houve uma associação entre os tipos de anomalias numéricas e a graduação tumoral, sendo a trissomia 7 e a monossomia 9 mais comuns nos tumores de graus I e II e nas cistites, enquanto que nos tumores de graus III e IV invasivos ocorrem principalmente polissomias dos cromossomos 7, 9 e 17 e poliploidias;
- c. Estes cromossomos podem ser utilizados em testes citogenéticos como marcadores cromossômicos, tanto para o diagnóstico precoce como para o acompanhamento clínico dos pacientes com tumores da bexiga;
- d. Lesão benigna da bexiga como cistite crônica e o urotélio normal da bexiga, de pacientes com tumores vesicais podem conter alterações cromossômicas importantes relacionadas à progressão tumoral e risco elevado de recorrências;
- e. O urotélio normal de pacientes com câncer da bexiga não consiste, portanto, um tipo adequado de tecido para ser utilizado como controle em estudos genéticos, mas pode indicar a ocorrência de alterações primárias envolvidas na carcinogênese desse órgão;
- f. As células de descamação do urotélio da bexiga de indivíduos jovens e saudáveis, obtidas após sedimentação da urina, constituem um sistema simples e não-invasivo para investigações cromossômicas pela técnica FISH.

VII. Resumo

VII. Resumo

O prognóstico do câncer da bexiga depende do tipo e grau histológico e coloitológico, bem como da extensão da doença. O tipo histológico coloitológico do câncer da bexiga é o mais comum, sendo o carcinoma papilífero o mais frequente. Alguns estudos genéticos têm associado a ocorrência de alterações cromossômicas a um grupo específico de tumor e oncogenes como *CCN40*, *ARF*, *Rb*, *TP53*, *BCL-2*, *c-ERBB-2* e o receptor *EGF-R*, com os produtos de iniciação e progressão tumoral da bexiga. A progressão desses tumores parece ocorrer conjuntamente com a aquisição de anormalias cromossômicas como alterações em 5q, 9q e 17p e ganhos em 1q, 11q, 6p, 7p e 17q.

Em decorrência da incidência elevada dos tumores da bexiga e da necessidade de se estabelecer marcadores cromossômicos, que possam auxiliar no diagnóstico precoce e na fase de recidiva, propõe-se o presente trabalho. Foi investigada pela técnica FISH, com sondas centroméricas e satélites *c-her2* a presença de anormalias numéricas envolvendo os cromossomos 7, 9 e 17, em núcleos intermitentes de tecido fresco de quatorze tumores malignos da bexiga, duas células críticas e três biópsias de bexiga normal, provenientes de pacientes com CCOT. Como controle utilizamos células de carcinoma de células de transição da bexiga após amputação de uma e cinco amostras de tecido de indivíduos saudáveis. A análise estatística evidenciou diferenças significativas entre estas amostras controladas, optando-se portanto, em utilizar os valores obtidos nas células de transição da bexiga. Dessa forma, estabelecemos os limites de corte para anormalias dos cromossomos 7, 9 e 17, em células de transição da bexiga, a partir de quatro casos positivos, observados para cada um desses cromossomos no grupo controle.

A técnica FISH evidenciou nos tumores malignos da bexiga, trissomia 7 em 85,7% (12/14) das amostras, trissomia 9 em 23,8% (4/14) e trissomia ou tetrasomia 17 em 57,1% (8/14) das amostras. As duas amostras de células críticas obtidas de pacientes com recidiva de CCOT apresentaram principalmente trissomia 7 e tetrasomia 9. Em uma das três amostras da bexiga

VII. Resumo

VII. Resumo

O prognóstico do câncer da bexiga depende do tipo e grau histológico e principalmente, do estágio clínico na época do diagnóstico. O tipo histológico predominante do câncer da bexiga é o carcinoma de células transicionais (CCT). Alguns estudos genéticos têm associado a ocorrência de alterações cromossômicas e em genes supressores de tumor e oncogenes, como *CDKN2*, *ARF*, *RB*, *TP53*, *BCL-2*, *c-ERBB-2* e o receptor EGF-R, com os processos de iniciação e progressão tumoral da bexiga. A progressão desses tumores parece ocorrer conjuntamente com a aquisição de anomalias cromossômicas como deleções em 9p, 9q e 17p e ganhos em 1q, 11q, 5p, 7p e 17q.

Em decorrência da incidência elevada dos tumores da bexiga e da necessidade em se estabelecer marcadores cromossômicos, que possam auxiliar no diagnóstico precoce e no risco de recorrência, propôs-se o presente trabalho. Foi investigada pela técnica FISH, com sondas centroméricas e satélite clássica a presença de anomalias numéricas envolvendo os cromossomos 7, 9 e 17, em núcleos interfásicos de tecido fresco de quatorze tumores malignos da bexiga, duas cistites crônicas e três biópsias de bexiga normal, provenientes de pacientes com CCT. Como controle utilizou-se cinco amostras de células de descamação da bexiga, após sedimentação da urina e cinco amostras de linfócitos cultivados, ambas de indivíduos saudáveis. A análise estatística evidenciou diferenças significativas entre essas amostras controles, optando-se portanto, em utilizar os valores obtidos nas células de descamação da bexiga. Dessa forma, estabeleceu-se os limites de corte para aneuploidias dos cromossomos 7, 9 e 17, a partir do cálculo da média acrescida de quatro desvios padrões, referente aos sinais observados para cada um desses cromossomos no grupo controle.

A técnica FISH evidenciou nos tumores malignos da bexiga, trissomia e/ou tetrassomia 7 em 85,7% (12/14) dos casos, monossomia 9 em 28,6% (4/14) e trissomia ou tetrassomia 17 em 57,1% (8/14) das amostras. As duas amostras de cistites crônicas oriundas de pacientes com recorrências de CCT apresentaram principalmente trissomia 7 e monossomia 9. Em uma das três amostras da bexiga

normal, também provenientes de pacientes com CCT, detectou-se as mesmas anomalias numéricas (polissomias 7, 9 e 17) observadas no tecido tumoral. As outras duas amostras apresentaram apenas trissomia 7. Comparando-se os CCT de baixo grau (I) com os mais invasivos (II a IV) e o carcinoma anaplásico indiferenciado (CAI), verificou-se um número maior de aneuploidias nos tumores de grau elevado, que apresentaram principalmente trissomias e tetrassomias dos cromossomos 7, 9 e 17, caracterizando a ocorrência de polissomias e instabilidade genética. Nos CCT de grau I e II observou-se mais freqüentemente trissomia 7 associada com aneuploidias do 9. Assim sugerindo uma relação entre a histopatologia dos tumores e as anomalias numéricas observadas.

O presente estudo indica a participação dos cromossomos 7, 9 e 17 na carcinogênese da bexiga, sendo que alterações dos cromossomos 7 e 9 estão mais envolvidas no processo de iniciação e do cromossomo 17, com progressão e recorrência tumoral. Nesses cromossomos encontram-se respectivamente, os genes *ERBB*, *CDKN2* e *c-ERBB-2*, cujos produtos exercem funções importantes na regulação do ciclo celular. Portanto, avaliações genéticas utilizando esses cromossomos associadas com estudos moleculares dos respectivos genes podem ser indicadas para o diagnóstico precoce em indivíduos de risco e acompanhamento daqueles com risco de recorrência e metástases.

Palavras chaves: tumor da bexiga, cistite, hibridação in situ fluorescente, cromossomo 7, cromossomo 9, cromossomo 17, aneuploidia.

VIII. ABSTRACT

VIII. ABSTRACT

VIII. ABSTRACT

VIII. Abstract

The prognostic of bladder cancer has been related to histological type and grade and to the clinical stage of era diagnostic, in special. The predominant histological type of bladder cancer is transitional cell carcinoma (TCC). Some genetic studies has associated the occurrence of chromosome alterations and in tumours supressor genes and oncogenes, such as *CDKN2*, *ARF*, *RB*, *TP53*, *BCL-2*, *c-ERBB-2* and the receptor EGF-R to process of the initiation and progression of bladder tumours. The tumour progression appears to occur jointly with the acquisition of chromosomal abnormalities as deletions of 9p, 9q and 17p and gain of 1q, 5p, 7p, 11q, and 17q.

Due to higher incidence of bladder tumours and necessity to identify chromosome markers to help early diagnostic and risk of recurrence, the present study was carried. The fluorescence in situ hybridization (FISH) were used to investigate numerical chromosome alterations with 7, 9 and 17 centromeric and classical satellite probes in interphase nuclei of fresh tissues. We have analyzed fourteen bladder malignant tumours, two inflammation chronic and three normal urothelium biopsies from patients with TCC. Five bladder descamation cell samples and five lymphocytes specimens both originated of health people were used as a control. As the statistics analysis showed significative difference between both control samples we have used the values obtained in bladder descamation cells. The cutoff criteria was defined adding four standard deviations to the averages of the bladder descamation cells data.

FISH analysis of the bladder malignant tumours have showed trisomy 7 and/or tetrasomy 7 in 85,7% (12/14) of the samples, monosomy 9 in 28,6% (4/14) and trisomy or tetrasomy 17 in 57,1% (8/14) of the samples. The two samples of cystites from the patient with TCC recurrence showed trisomy 7 and monosomy 9, as the most important alterations. One of three samples of the normal bladder, also originated from the patient with TCC, showed the same numerical alterations (polisomy 7, 9 and 17) of the tumoral tissue. However, the other two samples showed only trisomy 7. The comparative analysis of low grade (I) with invasive (II



until IV) TCC and indifferenciado anaplasico carcinoma showed higher number of the aneuploidy in higher grade tumours. These tumours showed increased frequency of the trisomy and tetrasomy 7, 9 and 17, characterizing the polysomy and genetic instability. In TCC grade I and II there were frequently observed trisomy 7 associated with aneuploidy 9, thus suggesting the existence of a relationship between the histopathology of the tumours and the numerical alterations.

This study indicates the participation the chromosomes 7, 9 e 17 in urothelial carcinogenesis: the alterations of the chromosomes 7 and 9 were related to the initiation process and the chromosome 17 with tumoral progression and recurrence. In these chromosomes are mapped the *ERBB*, *CDKN2* and *c-ERBB-2* genes, respectively, whose products to perform important functions in the regulation of celular cicle. Therefore, genetic evaluation using these chromosomes associated to molecular studies may be indicated for early diagnostic in patient of the risk and the following of that ones with recurrence and metastasis risk.

Key words: bladder tumour, cystites, fluorescence in situ hybridization, chromosome 7, chromosome 9, chromosome 17, aneuploidy.

IX. Referências Bibliográficas

IX. Referências Bibliográficas

AL ALBADI, H., NABEL, R. Deoxyribonucleic acid content and survival rates of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, v. 151, p.37-42, 1994.

ALY, S. M., KLALED, H. M. Chromosomal aberrations in bilateral bladder cancer as detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 114, p.62-67, 1999.

AUGUSTSSON, K., SKOG, K., JÄGERSTAD, M.M., DICKMAN, P. W., STEINECK, G. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder and kidney: a population-based study. *Lancet*, v. 353, p.703-707, 1999.

BALAZS, M., CARROLL, P., KERSCHMANN, R., SAUTER, G., WALDMAN, F.M. Frequent homozygous deletions of cyclin-dependent kinase inhibition 2(MTS), p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Genes, Chromosomes, Cancer*, v. 13, p. 34-39, 1997.

BARRIL, N., SALLES, A. B. C. F. & LAJARAE, H. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, v. 114, p. 162-164, 1999.

BARTLETT, J. M., WATSON, J. P., BALABANE, S., GONG, J. L., BRIGGS, K. M., COOKE, J. D. Is there a common pathway for the development of transitional cell carcinoma of the urinary bladder? *Br. J. Cancer*, v. 77, p. 2193-2198, 1998.

BAUD, E., CATILINA, P., BORTEUX, J. P., BIGNON, Y. J. Human bladder cancer and normal bladder mucosa present the same hot spot of heterozygous chromosome 9 deletion. *Int. J. Cancer*, v.77, 821-824, 1996.

IX. Referências Bibliográficas

IX. Referências Bibliográficas

- AL ALBADI, H.; NAGEL, R. Deoxyribonucleic acid content and survival rates of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. **J. Urol.**, v. **151**: p.37-42, 1994.
- ALY, S. M.; KLALED, H. M. Chromosomal aberrations in bilharzial bladder cancer as detected by fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. **114**: p.62-67, 1999.
- AUGUSTSSON, K.; SKOG, K.; JÄGERSTAD, M.M.; DICKMAN, P. W.; STEINECK, G. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder and kidney: a population-based study. **Lancet**, v. **353**: p.703-707, 1999.
- BALÁZS, M.; CARROLL, P.; KERSCHMANN, R.; SAUTER, G.; WALDMAN, F.M. Frequent homozygous deletions of cyclin-dependent kinase inhibition 2(MTS1, p16) in superficial bladder cancer detected by fluorescence *in situ* hybridization. **Genes, Chromosom. Cancer**, v. **19**, p. 84-89: 1997.
- BARRIL, N.; SALLES, A. B. C. F. & TAJARA E. H. Interphase cytogenetic analysis of normal tissue of thyroid gland by fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. **114**: p. 162-164, 1999.
- BARTLETT, J. M.; WATTERS, A. D.; BALLANTYNE, S.A.; GOING, J. J.; GRIGOR, K. M.; COOKE, T. G. Is chromosome 9 loss a marker of disease recurrence in transitional all carcinoma of the urinary bladder? **Br. J. Cancer**, v. **77**: p. 2193-2198, 1998.
- BAUD, E.; CATILINA, P.; BOITEUX, J. P.; BIGNON, Y. J. Human bladder cancers and normal bladder mucosa present the same hot spot of heterozygous chromosome 9 deletion. **Int. J. Cancer**, v. **77**: 821-824, 1998.



BEERMAN, H.; KLUIN, P. M.; HERMANS, J.; van DE VELDE, C. J. H.; CORNELISSE, C. J. Prognostic significance of DNA-ploidy in a series of 690 primary breast cancer patients. **Int. J. Cancer**, v. 45: p. 34-39, 1990.

BENDER, M. J.; AWA, A. A.; BROOKS, A. L.; EVANS, H. J.; GROER, P. G.; LITTLEFIELD, L. G.; PEREIRA, C.; PRESTON, R. J.; WACHHOLZ, B. W. Current status of cytogenetic procedures to detect and quantify previous exposures to radiation. **Mutat. Res.**, v.196: p. 103-159, 1988.

BRISSENDEN, J.E.; DERYNCK, R.; FRANCKE, U. Transforming growth factor alpha gene (TGFA) maps to human chromosome 2 close to the breakpoint of the t(2;8) variant translocation in Burkitt lymphoma. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 40: p.589, 1985.

BRUCH, J.; WOHR, G.; HAUTMANN, R.; MATTFELDT, T.; BRUDERLEIN, S.; MOLLER, P.; SAUTER, S.; HAMEISTER, H.; VOGEL, W.; PAISS, T. Chromosomal changes during progression of transitional cell carcinoma of the bladder and delineation of the amplified interval on chromosome arm 8q. **Genes, Chromosom. Cancer**, v. 23: p. 167-178, 1998.

CAMPBELL, S. C.; VOLPERT, O. V.; IVANOVICH, M.; BARCK, N. P. Molecular mediators of carcinogenesis in bladder cancer. **Cancer Res.**, v. 58: p. 1298-1304, 1998.

CHATUVERDI, V.; HODGES, S.; JOHNSTON, D.; RO, J. Y.; LOGOTHETIS, C.; VON, ESCHENBACH, A. C.; BATSAKIS, J. G.; CZERNIAK, B. Superimposed histologic and genetic mapping of chromosome 17 alterations in human urinary bladder neoplasia. **Oncogene**, v.14: p. 2059-2070, 1997.

- CHENG, L.; CHEVILLE, J. C.; NEUMANN, R. M.; BOSTWICK, D. G. Natural history of urothelial dysplasia of the bladder. **Am. J. Surg. Pathol.**, v.23: p.443-447, 1999.
- CHI, S. G.; CHANG, S. G.; LEE, S. J.; LEE, C. H.; KIM, J. I.; PARK, J. H. Elevated and biallelic expression of p73 is associated with progression of human bladder cancer. **Cancer Res.**, v.59: p.2791-2793, 1999.
- CHIANG, T.; FEN, W.; YING, L. S.; WANG, L.; KO, Y. Mutagenicity and aromatic amine content of fumes from the heated oils produced in Taiwan **Food Chem. Toxicol.**, v. 37: p.125-134, 1999.
- CHOONG, P. F. M.; RYDHOLM, A.; MERTENS, F.; MANDAH, N. Advances in cytogenetics and molecular genetics and their clinical implications. **Acta Oncol.**, v. 36: p. 245-254, 1997.
- CORDON-CARDO, C.; ZHANG, Z. F.; DALBAGNI, G.; DROBNJAK, M.; CHARYTONOWICZ, E.; HU, S. X.; XU, H. J.; REUTER, V. E.; BENEDICT, W. F. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumours. **Cancer Res.**, v. 57: p. 1217-1221, 1997.
- COTE, R. J.; DUNN, M. D.; CHATTERJU, S. J.; STEIN, J. P.; SHI, S. R.; TRAN, Q. C.; HU, S. X.; XU, H. J.; GROSHEN, S.; TAYLOR, C. R.; SKINNER, D. G.; BENEDICT, W. F. Elevated and absent pRB expression is associated with bladder cancer progression and *Has* cooperative effects with p53. **Cancer Res.**, v. 58: p. 1090-1094, 1998.
- COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**, 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 130p., 1991.

CZERNIAK, B.; DEITCH, D.; SIMMONS, H.; ELKIND, P.; HERZ, F.; KOSS, L.G. *H-ras* gene codon 12 mutations and DNA ploidy in urinary bladder carcinomas. **Br. J. Cancer**, v.62: p. 762, 1990.

CZERNIAK, B.; COHEN G.L.; ELKIND, P. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the *H-ras* gene in urinary bladder carcinomas. **Hum. Pathol.**, v.23: p.1499, 1992.

DALESSANDRO, I.; ZITZELSBERGER, H.; HUTZLER, P.; LEHMANN, L.; BRASELMANN, H.; CHIMENTI, S.; HÖFLER, H. Numerical aberrations of chromosome 7 detected in 15 microns paraffin-embedded tissue sections of primary cutaneous melanomas by fluorescence *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. **J. Cutan. Pathol.** v. 24: p. 70-75, 1997.

DEVERE, W. R.; DEITCH, A.; WEST, B.; FITZPATRICK, J. The predictive value of flow cytometric information in the clinical management of stage O (Ta) bladder cancer. **J. Urol.**, v. 139: p. 279-282, 1988.

DE-VITA, V. T. JR.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer-Principles e Practice of Oncology**, 5th ed. v.1: Philadelphia, New York:Lippincott-Raven, p.1154, 1997.

DONEHOWER, L. A.; BRADLEY, A. The tumour suppressor p53. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1155: p.181-205, 1993

EASTMOND, D. A.; SCHULER, M.; RUPA, D. S. Advantages and limitations of using fluorescence *in situ* hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. **Mutat. Res.**, v.348: p.153-162, 1995.

FALD-ELMULA, I.; GORUNOVA, L.; LUNDGEN, R.; MANDAHL, N.; NORSBY, N.; MITELMAN, F.; HEIM, S. Chromosomal abnormalities in two bladder

- carcinomas with secondary squamous cell differentiation. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 102: p. 125-130, 1998a.
- FALD-ELMULA, I.; BONALDI, L.; GORUNOVA, L.; MANDAHL, N.; ELFVING, P.; HEIM, S. Cytogenetic heterogeneity in a second primary radiation-induced bladder carcinoma tem karyotypically unrelated clones. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 105: p. 134-137, 1998b.
- FUJITA, J.; STRIVASTAVA, S. K.; KRUS, M. H. Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogene in human urinary tract tumours. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82: p.3849-3853, 1985.
- GARCIA, M.V.; TAJARA, E. H. Métodos para análise de cromossomos humanos. Manual de Protocolos, 1991.
- GAZZANIGA, P.; GRADILONE, A.; SILVESTRI, I.; GANDINI, O.; NAPOLITANO, M.; VERCILLO, R.; VICENZONI, A.; GALLUCI, M.; FRATI, L.; AGLIANO, A. M. High levels of transforming growth factor-alpha ($TGF-\alpha$) mRNA may predict local relapses in early stage urinary bladder cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 34: p.934-936, 1998.
- GHALEB, A. H.; PIZZOLO, J. G.; MELAMED, M.R. Aberrations of chromosomes 9 and 17 in bilharzial bladder cancer as detected by fluorescence *in situ* hybridization. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.106: p.234-241, 1996.
- GODDARD, A. D.; SOLOMON, E. Genetic aspect of cancer. In: HARRIS, K. HIRSCHHORM B. (Ed.). **Advanced in Human Genetics**. London, Plenum Press, 1993.



- GUSTAFSON, H.; TRIBUKAIT, B.; ESPOSTI, P. The prognostic value of DNA analysis in primary carcinoma in situ of the urinary bladder. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, v.16: p. 141-146, 1982.
- HABUCHI, T.; DEVLIN, J.; ELDER, P. A.; KNOWLES, M. A. Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. **Oncogene**, v.11: p. 1671-1674, 1995.
- HANNON, G. J.; BEACH, D. p15 *INK4B* is a potential effector of TGF β induced cell cycle arrest. **Nature**, v.368: p.753-756, 1994.
- HANSEN, R.; OREN, M. p53: from inductive signal to cellular effect. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v.7: p.46-51, 1997.
- HARTMANN, A.; MOSER, K.; KRIEGMAIR, M. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma, **Am. J. Pathol.**, v.154: p.721-727, 1999.
- HEIM & MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics**, New York: Alan R. Liss, 534p., 1995.
- HOCHENBERY, D.M.; ZUTTER, M.; HICKEY, W. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.88: p.6961-6965, 1991.
- HONG, F.D.; HUANG, H.J.S.; TO, H.; YOUNG, L.J.S.; ORO, A.; BOOKSTEIN, R.; LEE, E. Y.H. P.; LEE, W-H. Struture of the human retinoblastoma gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86: p.5502-5506, 1989.
- HOPMAN, A. H. N.; RAMAEKERS, F. C. S.; RAAP, A. K.; BECK, J. L. M.; DEVILEE, P.; PLOEG, M.; VOOIJS, G. P. *In situ* hybridization as a tool to study

- numerical chromosome aberrations in solid bladder tumours. **Histochemistry**, v.89: p.307-316, 1988.
- HOVEY, R. M.; CHU, L.; BALÁZS, M.; DEVRIES, S.; MOORE, D.; SAUTER, G.; CARROLL, P. R.; WALDMAN, F. M. Genetic alterations in primary bladder cancer and their metastases. **Cancer Res.**, v. 58: p. 3555-3560, 1998.
- HUEBNER, K.; NOWELL, P. C.; CROCE, C. M. Lineage-specific gene rearrangement/deletion: a nonconservative model. **Cancer Res.**, v. 49: p. 4071-4074, 1989.
- HUGHSON, M. D.; DICKMAN, K.; BIGLER, S. A.; MELONI, A.M.; SANDBERG, A. A. Clear-cell and papillary carcinoma of the kidney: an analysis of chromosome 3, 7, and 17 abnormalities by microsatellite amplification, cytogenetics, and fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 106: p. 93-104, 1998.
- HUMPREY, G.M.; SQUIRE, M.; LANSDOWN, A.; MARKHAM, A. Cytogenetics and the surgeon: an invaluable tool in diagnosis, prognosis and counselling of patients with solid tumours. **Brit. J. Surg.**, v. 85: p.725-734, 1998.
- INCA, INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER, 1999.
- ISOBE, M.; EMANUEL, B. S.; GIVOL, D.; OREN, M.; CROCE, C. M. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. **Nature**, v.320: p.84-85, 1986.
- JACOB, S. W.; FRANCONI, A. **Anatomia e Fisiologia Humana**, Interamericana, 3ª ed., 1974.



- JOHANSSON, B.; HEIM, S.; MANDAH, N.; MERTENS, F.; MITELMAN, F. Trisomy 7 in nonneoplastic cells. **Genes Chromosom. Cancer**, v. 6: p. 199-205, 1993.
- KAMB, A.; GRUIS, N. A.; WEAVER-FELDHAUS, J.; LIU, Q.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S. V.; STOCKERT, E.; DAY, R. S.; JOHNSON, B. E.; SKOLNICK, M. H. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumour types. **Science**, v.264: p.436-440, 1994.
- KINGSLEY, K. L.; PEIER, A. M.; MELONI-EHRIG, A. M.; SANDBERG, A. A. Cytogenetic findings in a bladder chondrosarcoma. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 96: p. 183-184, 1997.
- KNUDSON, A. G. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. **Cancer Res.**, v.45: p.1437-1443, 1985.
- KONG, G.; SHIN, K. Y.; OH, Y. H.; LEE, J. J.; PARK, H. Y.; WOO, Y. N.; LEE, J. D. Bcl-2 and p53 expressions in invasive bladder cancers. **Acta Oncol.**, v.37: p.715-720, 1998.
- KONTOGEORGOS, G.; ANINOS. D. Recent aspects in the diagnosis and prognosis of bladder cancer. **Tumori**, v.84: p.301-307, 1998.
- LANDIS, S.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P. A. Cancer statistics. **Ca. Cancer J. Clin.**, v.48: p. 6-29, 1998.
- LEE, S. H.; SHIN, M. S.; PARK, W. S.; KIM, S. Y.; DONG, S. M.; PI, J. H.; LEE, H. K.; KIM, H. S.; JANG, J. J.; KIM, C. S.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; YOO, N. J. Alterations of *Faz (APO-1/CD95)* gene in transitional cell carcinomas of urinary bladder. **Cancer Res.**, v.59: p.3068-3072, 1999.



- LEVINE, A.J.; PERRY, M.E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.W.M.; WELSH, D. The 1993 Walter hubert Lecture: The role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, v.69: p.409-416, 1994.
- LINN, J. F., SESTERHENN, I., MOSTOFI, F. K., SCHOENBERG, M.. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. **J. Urol.** v.159, p.1493-1496, 1998.
- LOTEM, J.; SACHS, L. Regulation by bcl-2, c-myc and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and-defective myeloid leukemic cells. **Cell. Growth. Differ.**, v.4, p.41-47, 1993.
- LU, Q. L.; ABEL, P.; FOSTER, C.S.; LALANI, E.N. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. **Hum. Pathol.**, v.27, p.102-110, 1996.
- LUKE, S.; VARKEY, J.A.; BELOGOLOVKIN, V.; LADOULIS, C. Current state of fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnostic pathology. **Cell Vision**, v. 4, 1997.
- MAHDY, E.; YOSHIHIRO, S.; ZECH, L. Comparasion of comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization and flow cytometry in urinary bladder cancer. **Anticancer Res.**, v.19, p.7-12, 1999.
- MARKL, I. D. C. & JONES, P. A. Presence and localization of *TP53* mutation determines pattern of *CDKN2A/ARF* pathway inactivation in bladder cancer. **Cancer Res.**, v. 58, p.5348-5353, 1998.
- MIKHAILIDIS, D. P.; GANOTAKIS, E. S.; PAPADAKIS, J. A.; JEREMY, J. Y. Smoking and urological disease. **J. R. Soc. Health**, v.118, p.210-212, 1998.

MORIYAMA, M. AKIYAMA, T.; YAMAMOTO, T.; KAWAMOTO, T.; KATO, T., SATO K.; WATANUKI, T.; HIKAGE, T.; KATSUTA, N.; ORI, S. Exp[ression of c-erbB-2 gene in urinary bladder cancer. **J. Urol.**, v.145, p.423-427, 1991.

NAKOPOULOU, L.; VOURLAKOU, C.; ZERVAS, A.; TZONOU, A.; GAKIOPOULOU, H.; DIMOPOULOS, M.A. The prevalence of bcl-2, p53, and ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. **Hum. Pathol.**, v.29, p.146-154, 1998.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G. Screening of human populations for mutations induced by environmental pollutants: use of human lymphocyte system. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, v.4, p.468-481, 1980.

NEUHAUS, M.; WAGNER, U.; SCHMID, U.; ACKERMANN, D.; ZELLWEGER, T.; MAURER, R.; ALUND, G.; KNONAGEL, H.; RIST, M.; MOCH, H.; MIHATSCH, M. J.; GASSER, T. C.; SAUTER, G. Polysomies but no Y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. **Hum. Pathol.**, v. 30, p. 81-86, 1999.

NORDENSON, I.; BECKMAN, L.; LIDÉN, S.; STJERNBERG, N. Chromosomal aberrations and cancer risk. **Hum. Hered.** v. 34, p. 76-81, 1984.

ORLOW, I.; LARUE, H.; OSMAN, I.; LACOMBE, L.; MOORE, L.; RABBANI, F.; MEYER, F.; FRADET, Y.; CORDON-CARDO, C. Deletions of the *INK4A* gene in superficial bladder tumours association with recurrence. **Am. J. Pathol.**, v.155, p.105-113, 1999.

PEZZELA, F.; TURLEY, H.; KUZU, I. Bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.690-694, 1993.

PRESTON, R. J.; SAN SEBASTIAN, J. R.; MCFEE, A. F. The *in vitro* human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Res.**, v. **189**, p. 175-183, 1987.

PYCHA, A.; MIAN, C.; POSCH, B.; HAITEL, A.; EL-BAZ, M.; GHONEIM, M. A.; MARBERG, M. Numerical aberrations of chromosome 7, 9 and 17 in squamous cell and transitional cell cancer of the bladder: a comparative study performed by fluorescence *in situ* hybridization. **J. Urol.**, v. **160**, p.734-740, 1998.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese Métodos e Critérios de Avaliação**, 1991.

REDDY, E.P.; REYNOLDS, R.K.; SANTOS, E.; BARBACID, M. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 bladder carcinoma oncogene. **Nature**. v. **300**, p.149, 1982.

REEDER, J. E.; OCONNELL, M. J.; YANG, Z.; MORREALE, J. F.; COLLINS, L.; FRANK, I. N.; MESSING, E. M.; COCKETT, A. T.; COX, C.; ROBINSON, R. D.; WHELLESS, L. L. DNA cytometry and chromosome 9 aberrations by fluorescence *in situ* hybridization of irrigation specimens from bladder cancer patients. **Urology**, v. **51**, p. 58-61, 1998.

RICHTER, J.; JIANG, F.; GOROG, J. P.; SARTORIUS, G.; EGENTER, C.; GASSER, T. C.; MOCH, H.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G. Marked genetic differences between stage pTa and stage pT1 papillary bladder cancer detected by comparative genomic hybridization. **Cancer Res.**, v. **57**, p. 2860-2864, 1997.

RICHTER, J.; BEFFA, L.; WAGNER U. R. S.; SCHRAML, 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.**, v.153, p. 1615-1621, 1998.
- RIED, T. Interphase cytogenetics and its role in molecular diagnostics of solid tumours. **Am. J. Pathol.**, v.152, 1998.
- ROCA, F.; PÉREZ-GÓMEZ, J. A.; CIGEDOSA, J. C.; GÓMEZ, E.; ESTÉVEZ, M. Genetic heterogeneity of benign thyroid lesions static and flow cytometry karyotyping and *in situ* hybridization analysis. **Anal. Cell. Pathol.** v.16, p. 101-110, 1998.
- ROQUE, L.; SERPA, A.; CLODE, A.; CASTEDO, S.; SOARES, J. Significance of trisomy 7 and 12 in thyroid lesions with follicular differentiation: a cytogenetic and *in situ* hybridization study. **Lab. Invest.**, v.79, p. 369-378, 1999.
- RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**, 1ª ed. Interlivros, 1990.
- SANDBERG, A. A.; BERGER, C.S. Review of chromosome studies in urological tumours: cytogenetics and molecular genetics of bladder cancer. **J. Urol.**, v.151, p.545, 1994.
- SAUTER, G.; MOCH, H.; WAGNER, U.; NOVOTNA, H.; GASSER, T. C.; MATTARELLI, G.; MIHATSCH, M. J.; WALDMAN, F. M. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 82, p. 163-169, 1995a.
- SAUTER, G.; MOCH, H.; GASSER, T. C.; MIHATSCH, M. J.; WALDMAN, F. M. Heterogeneity of chromosome 17 and *erb-2* gene copy number in primary and metastatic bladder cancer. **Cytometry**, v. 21, p. 40-46, 1995b.



SAUTER, G.; GASSER, T. C.; MOCH, H.; RICHTER, J.; JIANG, F.; ALBRECHT, R.; NOVOTNY, H.; WAGNER, U.; BUBENDORF, L.; MIHATSCH, M. J. DNA aberrations in urinary bladder cancer detected by flow cytometry and FISH. **Urol. Res.**, v.1, p. 37-43, 1997.

SEMBA, K.; KAMATA, N.; TOYOSHIMA, K.; YAMAMOTO, T. A. V. *erbB* related protooncogene, *c-erb-2*, is distinct from *c-erb-1*/epidermal factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, p.6497-6501, 1985.

SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v.79, p.551-555, 1994.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, v.274, p.1672-1677, 1996.

SIDRANSKY, D.; VONESCHENBACH, A.; AND TSAI, Y.C. Identification of p53 mutations in bladder cancers and urine samples. **Science**, v.252, p.706, 1991.

SIMON, R.; BÜRGER, H.; BRINDKSCHMIDT, C.; BÖCKER, W.; HERTLE, L.; TERPE, H. J. Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. **J. Pathol.** v. 185, p.345-351, 1998.

SPRUCK, C.I.; OHNESEIT, P.F.; AND GONZALEZ-ZULETA, M. Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. **Cancer Res.**, v.54, p.784, 1994.

SROUGI, M.; SIMON, S. D. **Câncer urológico**, Ed. Platina, 2ª ed., 468p. 1996.

SROUGI, M.; HERING, F. L. O. **Urologia diagnóstico e tratamento**, Ed. Roca, 1ª ed., 1998.

WAGNER, U.; SAUTER, G.; MOCH, H.; NOVOTNY, H.; LEPPER, R.; MIHATSCH, M. J.; WALDMAN, F. M. Pattern of p53, *c-erb-2*, and *APC* expression in

TARBIN, C. J.; BRADLEY, S.M.; BARGMANN, C.I.; WEINBERG, R. A.; PATAGEORGE, A.G.; SCOLNICK, E.M.; DHAR, R.; LOWY, D.R.; CHANG, E.H. Mechanism of activation of a human oncogene. **Nature**, v.300, p.143-149, 1982.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E. Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma **Science**, v.228, p.1440-1443, 1985.

VARELLA-GARCIA, M.; MC GAVRAN, L. Molecular Biology in clinical oncology a Workshop. Practical molecular cytogenetics. **Amer. Assoc. for Can. Res.**, Aspen Colorado, 30 junho- 05 julho, 1995.

VIEGAS-PEQUIGNOT, E.; DUTRILLAUX, B.; MAGDALENAT, H.; COOPEY-MORSAN, M. Mapping of single-copy DNA sequence on human chromosomes by *in situ* hybridization with biotinilated probes L: enhancement of detection sensibility by intensified fluorescence digital imaging microscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 582-586, 1989.

VIEIRA, S. Introdução à Bioestatística, 3ª ed. Campus, Rio de Janeiro, 294p, 1985.

VIETEN, L.; BELAIR, C. D.; SAVELIEVA, L.; JULICHER, K.; BROCKER, F.; BARDENHEWER, W.; SCHUTTE, J.; OPALKA, B.; REZNIKOFF, C. A. Minimal deletion of 3p13→14.2 associated with immortalization of human uroepithelial cells. **Genes, Chromosom. Cancer**, v. 21, p. 39-48, 1998.

VIRMANI, A.K.; TONK, V.; GAZDARI, A. Comparison between fluorescence *in situ* hybridization and classical cytogenetics in human tumours. **Anticancer Res.**, v.18, p.1351-1356, 1998.

WAGNER, U.; SAUTER, G.; MOCH, H.; NOVOTNA, H.; EPPER, R.; MIHATSCH, M. J.; WALDMAN, F. M. Pattern of p53, erbB-2, and EGF-r expression in



pre-malignant lesions of the urinary bladder. **Hum. Pathol.**, v.26, p.970-978, 1995.

WAGNER, U.; BUBENDORF, L.; GASSER, T. C.; MOCH, H.; GOROG, J. P.; RICHTER, J.; MIHCATSCH, M. J.; WALDMAN, F. M.; SAUTER, G. Chromosome 8p deletions are associated with invasive tumor growth in urinary bladder cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 753-759, 1997.

WALDMAN, F. M.; CAROLL, P. R.; CHEW, K.; FIELD, F.; GERMAN, L.; MAYALL, B. Interphase cytogenetics and proliferative activities in bladder carcinoma. **J. Urol.**, v.145, p.248^A, 1991.

WANG, M.; PERISSEL, B.; TAILLANDIER, J.; KEMERY, J.; FORCK, Y.; LAUTIER, A.; BENKHALIFA, M.; MALET, P. Nonrandom changes of chromosome 10 in bladder cancer detection by FISH to interphase nuclei. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 73, p. 8-10, 1994.

WANG, M.; PERISSEL, B.; MALET, P. Cytogenetic characterization of a bladder carcinoma cell line by fluorescence *in situ* hybridization. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 82, p. 170-174, 1995.

WEINBERG, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v.81, p.323-330, 1995.

WHO. The world health report-Genova:WHO, 1997.

WILLIAMS, G.T. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. **Cell**, v.65, p.1097-1098, 1991.

WOOD, D.; WARTINGER, D.D.; REUTER, V.; CORDON-CARDO, C.; FAIR, W.R.; CHAGANI, R.S. DNA, RNA and immunohistochemical characterization of the



HER-2/neu oncogene in transitional cell carcinoma of the bladder. **J. Urol.** **v.146**, p.1398, 1991.

YOKOGI, H.; WADA, Y.; MORIYAMA-GONDA, N.; IGAWA, M.; ISHIBE, T.
Genomic heterogeneity in bladder cancer as detected by fluorescence *in situ* hybridization. **Brit. J. Urol.**, **v. 78**, p. 699-703, 1996.

ENDEREÇOS ON-LINE:

Bladder .**Urology Page**, sd, disponível em: http://www.urolog.nl/uropage/blaas_e.html

Drinking fluids reduces bladder cancer risk, study finds, **CNN Interactive**, 1999, disponível em: <http://www.cnn.com/HEALTH/9905/05/bladder.cancer/>

Introduction to bladder cancer. **Onkolink**. University of Pennsylvania Cancer Center, 1999, disponível em: [wysiwyg://33/http://www.cancermed.upenn.edu](http://www.cancermed.upenn.edu).

ANEXO**I. IDENTIFICAÇÃO**

Nome:.....Prontuário:.....

Data de Nascimento:...../...../..... Sexo: () F () M

Grupo étnico: () caucasóide () negróide () mongolóide

Endereço:..... Fone:.....

Cidade:..... Estado:.....

Profissão atual:.....tempo de atuação:.....

Profissão anterior:.....tempo de atuação:.....

II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de cigarro: () Sim () Não () Ex-fumante

() Fumante Passivo

Há quantos anos:..... Quantidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores: () cistite () câncer (tipo:.....)
() outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores: () Sim () Não

Tipo:.....

- Cirurgias anteriores: () Sim () Não

Tipo:.....

- Uso de medicamentos: () Sim () Não

Tipo:..... duração:.....

- História de câncer na família (grau de parentesco):

() Sim (tipo:.....)

() Não

Data:...../...../..... Responsável pelo procedimento:.....



