

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DOS AGENTES
ANTINEOPLÁSICOS CISPLATINA E GENCITABINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA DE BEXIGA**

ELAINE APARECIDA DE CAMARGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética.

Botucatu - SP

2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITOS GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DOS AGENTES
ANTINEOPLÁSICOS CISPLATINA E GENCITABINA EM
CÉLULAS DE CARCINOMA DE BEXIGA**

Mestranda: Elaine Aparecida de Camargo

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Co-Orientadora: Dra. Glenda Nicioli da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Área de Concentração: Genética.

Botucatu - SP

2010

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

Camargo, Elaine Aparecida de.

Efeitos genotóxicos e mutagênicos dos agentes antineoplásicos
cisplatina e gencitabina em células de carcinoma de bexiga / Elaine
Aparecida de Camargo. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Daisy Maria Fávero Salvadori

Co-Orientador: Glenda Nicioli da Silva

Capes: 20206003

1. Bexiga – Câncer.

Palavras-chave: Bexiga; Carcinoma de células transicionais; Cisplatina;
Cometa; Gencitabina; Micronúcleo; 5637; RT4; T24.

À Deus,

Por estar sempre comigo e não deixar que eu desista dos meus sonhos...

“Com tua mão, ó meu Senhor Segura a minha... Pois não me atrevo a um passo só sem teu amparo, sem teu apoio... Eu não darei, eu só iria fraquejar, eu andaria a vacilar, sem tua mão a me sustentar... Mas se tua mão me segurar, eu correrei até voar... subirei apoiada em Ti” (Suehy Façanha)

Aos meus tesouros, meus pais Benedito Francisco de Camargo e Maria Aparecida Zanon de Camargo e a minha irmã Amanda Cristina de Camargo, pelo amor incondicional, por compreenderem os meus anseios e sonhos. Não é possível descrever em palavras os meus sentimentos por vocês!

Agradecimentos Especiais:

À Dra Daisy Maria Fávero Salvadori,

Pela orientação deste trabalho e por sua amizade. Tenho muito a te agradecer... Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você, pelos seus ensinamentos, paciência e pelo seu exemplo de dedicação. A você, todo meu respeito, minha admiração e meus sinceros sentimentos.

À Glenda Nicioli da Silva,

Pela co-orientação deste trabalho, por não medir esforços em me auxiliar, pelo seu incentivo, amizade, ensinamentos e paciência. Sua contribuição foi muito importante para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

Aos colegas do **Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica:** Renato, Bruno, Camila Gobette, Kamila Kihara, Drielle, Eliana Minicucci, Juliana Petrochelli, Juliana Dorico, Magaly, Marília, Bárbara e Luciana. Em especial ao amigo João Paulo de Castro Marcondes pela fiel amizade, por dividir comigo momentos alegres e de dificuldades e por sempre me apoiar. À Danielle Cristina de Almeida, por estar sempre presente em minha vida, por seu carinho, conselhos e amizade. À amiga Mariana Gobbo Braz, pelo carinho, incentivo e apoio. Obrigada pelo carinho e agradável companhia.

Ao amigo Tony Fernando Grassi, pelo incentivo desde o início dos meus estudos, por estar sempre presente e por não medir esforços para me ajudar.

Ao meu querido amigo e cunhado Renan, por suas orações, carinho e momentos de alegria. Ao Gui Valim, por surgir em minha vida de maneira tão especial e me proporcionar momentos tão alegres.

Aos amigos Maria Luiza Falaguera Ardanaz e Bruno Ribeiro Darros pela amizade, carinho e apoio.

À Cristina Aparecida Alquati Dorico, pelo carinho e por sempre estar disposta a nos ajudar.

Aos meus queridos amigos de longos anos,
Alessandra (Chilena), Robson, Aline, Tony, Telma, Fabiano, Césinha, Laudicéia, Éder, Renata, Alessandro, Tati, Camila, Cris, Nice, Rafael, Wanderson, Renato, Fernanda, Alessandra (Nanda), Léo, Carol, Bianca, Marcel. Não poderia me esquecer dos mais novos membros desse grupo, Laura, Julia, Raquel e minha querida afilhada Nicole. Obrigada por compreenderem minhas ausências. As boas amizades são como um tesouro que a cada dia se torna mais valioso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Apoio Financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Índice Geral

Índice de Tabelas.....	i
Índice de Figuras.....	ii
Resumo.....	1
 I. INTRODUÇÃO.....	 3
Câncer de Bexiga.....	3
Agentes quimioterápicos.....	9
Mutagenicidade	12
Teste do cometa.....	14
Micronúcleo.....	15
 II. OBJETIVOS.....	 17
 III. MATERIAL E MÉTODOS.....	 19
Linhagens celulares e agentes antineoplásicos	19
Genotoxicidade (teste do cometa).....	19
Mutagenicidade (teste do micronúcleo).....	22
Análise estatística.....	23
 IV. RESULTADOS.....	 24
 V. DISCUSSÃO.....	 36
 VI. CONCLUSÕES.....	 44
 VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 45

Índice de Tabelas

Tabela I. Danos no DNA (tail intensity) em células de carcinoma de bexiga – linhagem RT4, tratadas com cisplatina e/ou gencitabina.....	27
Tabela II. Danos no DNA (tail intensity) em células de carcinoma de bexiga – linhagem 5637, tratadas com cisplatina e/ou gencitabina.....	29
Tabela III. Danos no DNA (tail intensity) em células de carcinoma de bexiga – linhagem T24, tratadas com cisplatina e/ou gencitabina.....	31
Tabela IV. Frequência de micronúcleo (MN) em células 5637 tratadas com cisplatina.....	33
Tabela V. Frequência de micronúcleo (MN) em células T24 tratadas com cisplatina	34
Tabela VI. Índice de divisão nuclear da linhagem 5367 após tratamentos com a gencitabina e com a combinação cisplatina (CIS) e gencitabina (GEN).....	34
Tabela VII. Índice de Divisão Nuclear (IDN) da linhagem T24 após tratamentos com a gencitabina e com a combinação cisplatina (CIS) e gencitabina (GEN).....	35

Índice de Figuras

Figura 1. Camadas celulares do epitélio de transição (adaptado de Lewis, 2000).	4
Figura 2. Formação e efeito dos aductos de cisplatina (adaptado de Wang & Lippard, 2005).	10
Figura 3. Estrutura química da gencitabina (2',2'-difluorodeoxicitidina) (adaptado de Vogelzang & Stadler 1999).	12
Figura 4. Origem e formação do micronúcleo e ponte nucleoplasmática (adaptado de Fenech, 2007).	16
Figura 5. Protocolo de tratamento para o teste do cometa.	21
Figura 6. Protocolo de tratamento para o teste do micronúcleo.	23
Figura 7. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) na linhagem de carcinoma de bexiga RT4 após tratamento com: A) cisplatina B) gencitabina e C) drogas combinadas; * $P < 0,01$ com relação ao respectivo controle negativo.	28
Figura 8. Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) na linhagem de carcinoma de bexiga 5637 após tratamento com: A) cisplatina B) gencitabina e C) drogas	

combinadas; * $P < 0,05$ com relação ao respectivo controle
negativo30

Figura 9. Danos no DNA (*tail intensity*) na linhagem de carcinoma de bexiga
T24 após tratamento com: A) cisplatina B) gencitabina e C) drogas
combinadas; * $P < 0,05$ com relação ao respectivo controle
negativo32

RESUMO

Os agentes químicos utilizados para o tratamento do câncer ativam vias de sinalização que levam ao bloqueio ou retardo no ciclo celular, ativação ou desativação de mecanismos de reparo do DNA e apoptose. Em relação ao câncer de bexiga, a combinação de cisplatina/gencitabina é considerada como protocolo quimioterápico padrão. Entretanto, o mecanismo exato de ação dessas drogas ainda não foi completamente elucidado, principalmente no que diz respeito à relação com o *status* do gene *TP53*, uma das principais alterações encontradas em células tumorais de bexiga. Considerando, portanto, a necessidade de terapias mais eficazes e com menos efeitos colaterais para o paciente, o entendimento das respostas celulares frente à exposição a agentes antineoplásicos pode trazer importantes informações sobre a sensibilidade celular em resposta aos tratamentos. Assim sendo, o presente estudo objetivou avaliar o potencial genotóxico e mutagênico dos antineoplásicos cisplatina e gencitabina em linhagens celulares de carcinoma de bexiga de diferentes graus histológicos e *status* do gene *TP53*. Para isso, foi realizado o teste do cometa em células RT4, de tumor de baixo grau e gene *TP53* selvagem; em células 5637, de tumor de alto grau e gene *TP53* mutado; e em células T24 de tumor de alto grau, com o gene *TP53* também mutado, mas com diferente tipo de mutação. O efeito mutagênico dos agentes quimioterápicos foi avaliado pelo teste do micronúcleo nas linhagens celulares

com o gene *TP53* mutado, 5637 e T24. Os resultados mostraram que pelo teste do cometa o tratamento com a cisplatina induziu aumento de danos primários no DNA (efeito genotóxico) somente na linhagem 5637; em relação a gencitabina, foram detectados aumentos significativos nas duas linhagens com o gene *TP53* mutado, nos dois momentos após o tratamento (6 e 24 horas); para a combinação cisplatina/gencitabina foi observado efeito genotóxico nas três linhagens e nos dois tempos de tratamento, com exceção da linhagem *TP53* selvagem, que somente apresentou danos estatisticamente significativos no tempo de 6 horas. No teste do micronúcleo, os dados evidenciaram o efeito mutagênico somente da menor concentração de cisplatina (0,5 μ M) na linhagem T24. Os tratamentos com a gencitabina e com combinação das duas drogas mostraram evidente efeito citostático nas linhagens celulares mutadas para o gene *TP53*. Concluindo, o tratamento simultâneo com a cisplatina e a gencitabina mostrou-se mais efetivo sobre as células de carcinoma de bexiga, independente do status do *TP53*, atuando por meio de mecanismos que não parecem associados a eventos aneugênicos e clastogênicos.

I. INTRODUÇÃO

Câncer de Bexiga

As neoplasias constituem-se na segunda causa de morte no Brasil, representando aproximadamente 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 (INCA, 2009). No caso do câncer de bexiga, o número de mortes em 2007 foi de 2.712, sendo 1.866 homens e 846 mulheres. Nos Estados Unidos, o carcinoma de bexiga é o 4^a câncer mais comum em homens e o 9^a em mulheres (Jemal et al., 2009); no mundo, essa neoplasia é a 9^a mais comum e a 13^a em causa de morte (Shelley et al., 2010). Caracterizada, principalmente, pela sua frequente recorrência, o câncer de bexiga representa uma das neoplasias de maior custo para os sistemas de saúde, já que é necessário acompanhamento clínico de rotina (citologia urinária e cistoscopia) (Castillo-Martin et al., 2010).

A principal função da bexiga urinária é servir como local de armazenamento temporário para a urina, que mantém composição similar à produzida pelos rins. Em mamíferos, a bexiga caracteriza-se por ser um órgão oco, composto pelas camadas serosa, muscular, submucosa, mucosa muscular, lâmina própria e uma camada de células epiteliais transicionais que cobre a superfície interna (Lewis, 2000). O urotélio, epitélio de transição de origem endodérmica, por sua vez, é composto de três camadas celulares morfológicamente distintas: as células basais, as células intermediárias e as

células superficiais, também chamadas “*umbrela*” (Figura 1) (Lewis, 2000; Castillo-Martin et al., 2010).

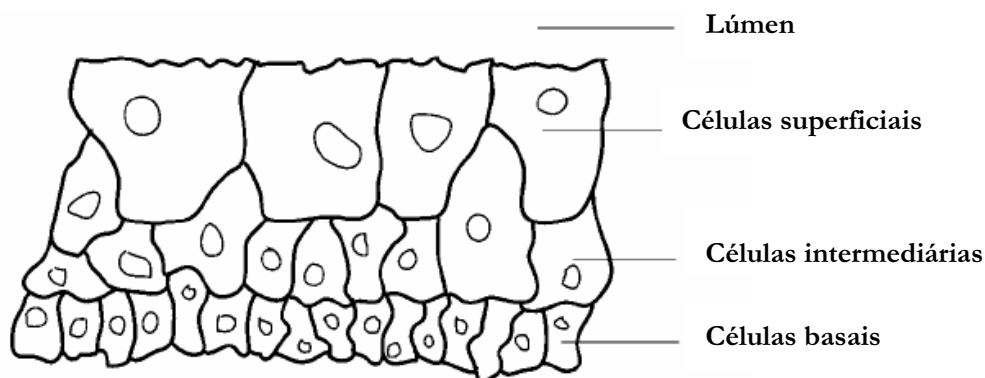


Figura 1. Camadas celulares do epitélio de transição (adaptado de Lewis, 2000).

As neoplasias de bexiga caracterizam-se por serem heterogêneas em relação ao comportamento clínico e histopatológico. Há três tipos de neoplasia que se iniciam nas células que revestem a mucosa da bexiga: o carcinoma de células de transição (CCT), que representa a maioria dos casos e se origina nas células epiteliais uroteliais; o carcinoma de células escamosas, que afeta as células delgadas e planas e que pode surgir na bexiga depois de infecção ou irritação prolongada; e o adenocarcinoma, que se inicia nas células glandulares (de secreção) e que pode se desenvolver na bexiga depois de um longo período de irritação ou inflamação. Aproximadamente 90% dos tumores urinários são do tipo CCT, sendo o restante representado pelos carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas e, raramente, por tumores derivados do mesênquima (Chester et al., 2004; Castillo-Martin et al., 2010).

Quando o câncer se limita ao tecido de revestimento da bexiga, é chamado de superficial. Quando, no entanto, se inicia nas células de transição e se dissemina através do revestimento da bexiga, invade a parede muscular e dissemina-se até os órgãos próximos ou nodos linfáticos, transforma-se em carcinoma invasivo (INCA 2010). Aproximadamente 70% dos pacientes com tumores superficiais têm recorrências, e somente cerca de 10% a 20% progridem para a invasão muscular (Smith, 1999).

A etiologia e os fatores de risco primário do câncer de bexiga são bem conhecidos, mas a sua alta taxa de recorrência e complexidade clínica dificultam sua detecção e tratamento, com reflexo na qualidade de vida do paciente (Latini et al., 2010). Os fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer de bexiga vêm sendo elucidados com base em dados obtidos a partir de observações clínicas, investigações epidemiológicas, pesquisas com animais de experimentação, estudos oncopatológicos e análises genéticas (Hirao et al., 2009). O câncer de bexiga é o principal câncer humano associado à exposição a carcinógenos exógenos. O tabagismo, a exposição ocupacional a esses agentes e as reações inflamatórias são considerados importantes fatores de risco para esse tipo de câncer. É estimado que 50% dos carcinomas de células de transição (CCT) sejam atribuídos ao cigarro. Arilaminas e outros 60 carcinógenos presentes na fumaça do cigarro já foram associados à formação de aductos de DNA e à alteração na expressão de genes supressores de tumor (Wallerand et al., 2005). Soma-se a isso, a maior

instabilidade genética encontrada em células uroteliais de indivíduos tabagistas (Gontijo et al., 2000). As aminas aromáticas presentes em corantes e muitos outros compostos sintéticos foram também relacionados ao câncer de bexiga (Golka et al., 2004; Rouissi et al., 2009). Recentemente, casos de câncer de bexiga associados à exposição ocupacional foram registrados em pintores, envernizadores, cabeleireiros e em trabalhadores de indústria têxtil, de couro e de borracha (Volanis et al., 2010).

Segundo Shariat et al. (2009) a idade é também considerada fator de risco para o carcinoma urotelial, uma vez que sua incidência aumenta progressivamente, sendo particularmente alta após os 60 anos, com um pico durante a septuagésima década de vida, quando o risco de desenvolvimento da doença é de 2% a 4% em homens e 0,5% a 1% em mulheres (Kirkali et al., 2005). Vários fatores associam o processo de envelhecimento à carcinogênese. Dentre eles, destaca-se a exposição crônica a agentes genotóxicos e/ou mutagênicos produzidos endogenamente, ou que estejam presentes no ambiente. Essa exposição pode levar ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que podem contribuir para a transformação maligna. Além disso, pode-se destacar a diminuição da capacidade de detoxificação de xenobióticos e a depleção dos sistemas de reparo do DNA, mecanismos inerentes ao processo de envelhecimento (Arai et al., 2008; Shariat et al., 2009).

A ausência de sintomas e de procedimentos clínicos específicos torna difícil a detecção precoce do câncer de bexiga. A hematúria é geralmente o

primeiro sintoma, ocorrendo em 85% dos pacientes, muito embora somente 10% desses apresentem hematúria macroscópica (Oosterlink et al., 2006; Latini et al., 2010). Uma vez diante da suspeita de CCT, a avaliação inicial consiste em citologia urinária, cistoscopia e investigação radiológica do trato urinário (Kaufman, 2006). Aqueles pacientes que são submetidos a procedimentos cirúrgicos para a ressecção do tumor são considerados de risco para o desenvolvimento neoplásico *de novo* (Qureshi et al., 2000) e, também, mais susceptíveis a recorrências e ao desenvolvimento de outros tipos de câncer do trato urotelial (Fleshner, 1999; Hisataki et al., 2001). Em 2001, Nilsson et al. atribuíram a possibilidade de recorrência do CCT à instabilidade genética urotelial que facilitaria o desenvolvimento de novas lesões.

Vários estudos demonstraram que inúmeras alterações genéticas e moleculares estão presentes no CCT, muito embora os mecanismos que levam ao fenótipo maligno não sejam, ainda, completamente entendidos (Catto et al., 2004). Sabe-se, no entanto, que o acúmulo de alterações genéticas, e não apenas uma única mutação, é o que vai determinar o comportamento clínico do CCT (Kim & Kim, 2006). Análises genéticas têm mostrado que os oncogenes *RAS* (correlação com recorrência) e *erb-B2* (correlação com sobrevida) e o fator de crescimento *EGF/EGFR* (correlação com recorrência e progressão) são os mais importantes marcadores prognósticos para o câncer de bexiga (Kausch & Bohle, 2002). Além disso, a

perda de segmento do cromossomo 9q foi observada principalmente em CCT papilar de baixo grau (Baithun et al., 2001).

As mutações no gene *TP53*, primeiro gene supressor tumoral a ser identificado, também são consideradas eventos genéticos comuns em tumores uroteliais e parecem estar relacionadas à progressão tumoral. Esse gene, que está localizado no cromossomo 17p13.1, codifica a proteína p53 que liga-se a seqüências específicas do DNA, formando uma estrutura tetramérica que atua na transcrição de genes importantes envolvidos no bloqueio do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA (Esrig et al., 1993; Soussi, 2007; Nishiyama et al., 2008; Vazquez et al., 2008). Em resposta aos danos no DNA, o *TP53* inibe rapidamente a progressão do ciclo celular na fase G1 – S e induz a transcrição de genes envolvidos no processo de apoptose. Além disso, ativa os sistemas de reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por excisão de base (BER), por recombinação homóloga (HR) e o *mismatch repair* (MMR), resultando na sobrevivência celular (Sengupta et al., 2005; Nishiyama et al., 2008). Diversos estudos para detecção de mutações no gene *TP53* têm sido desenvolvidos e aplicados no contexto clínico de vários tumores, incluindo os tumores uroteliais (Soussi T., 2000; Hernandez et al., 2005; Russo et al., 2005; Salani et al., 2008)

Agentes quimioterápicos

As drogas antineoplásicas, embora comumente utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer, não têm suas atividades restritas às células tumorais, mas podem causar danos genotóxicos em células saudáveis (Sanches-Suárez et al., 2008). Assim sendo, existe grande preocupação em se conhecer, detalhadamente, o mecanismo de ação dos medicamentos antitumorais, visando maior eficácia em seu uso e menores efeitos colaterais.

A cisplatina é um composto com ampla atividade antineoplásica, sendo utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres, dentre os quais os de testículo, pulmão, ovário, esôfago, cabeça e pescoço, mama e o carcinoma de bexiga. Apesar do sucesso clínico do tratamento com a cisplatina, seu uso é limitado devido a efeitos colaterais como neuropatia periférica, ototoxicidade, nefrotoxicidade e resistência intrínseca e adquirida (Wang & Lippard, 2005; Pang et al., 2007; Zhang et al., 2009). Alguns pesquisadores têm sugerido que para resultados mais promissores esta droga deve ser usada em associação à radioterapia ou a outros quimioterápicos. (Brabec & Kasparkova, 2005; Kim et al., 2005; Ecker et al., 2006).

A molécula de cisplatina possui um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia e torna-se ativa pela reação de moléculas de água com os íons cloreto, reagindo, assim, com biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e membranas fosfolipídicas (Wang & Lippard, 2005; Cho et al., 2008). Sabe-se que a atividade antitumoral da cisplatina é

resultado da sua interação com o DNA. Esta, ao entrar na célula, sofre reações que deixam a platina disponível para se ligar a bases do DNA e formar vários tipos de aductos que podem dar origem a ligações cruzadas intra e intercadeia (Figura 2) (Wozniak et al., 2004; Wang & Lippard, 2005; Rabik & Dolan, 2007). As alterações mais frequentemente observadas no DNA são os aductos entre guaninas adjacentes, que representam cerca de 65% de todas as lesões; 25% são representadas por aductos entre guanina e adenina e o restante é formado por ligações cruzadas intercadeias (Kartalou & Essigmann, 2001; Rabik & Dolan, 2007; Koberle et al., 2010). Os aductos cisplatina-DNA podem inibir processos celulares fundamentais que incluem replicação, transcrição, tradução e reparo de DNA (Wozniak et al., 2004; Cho et al., 2008).

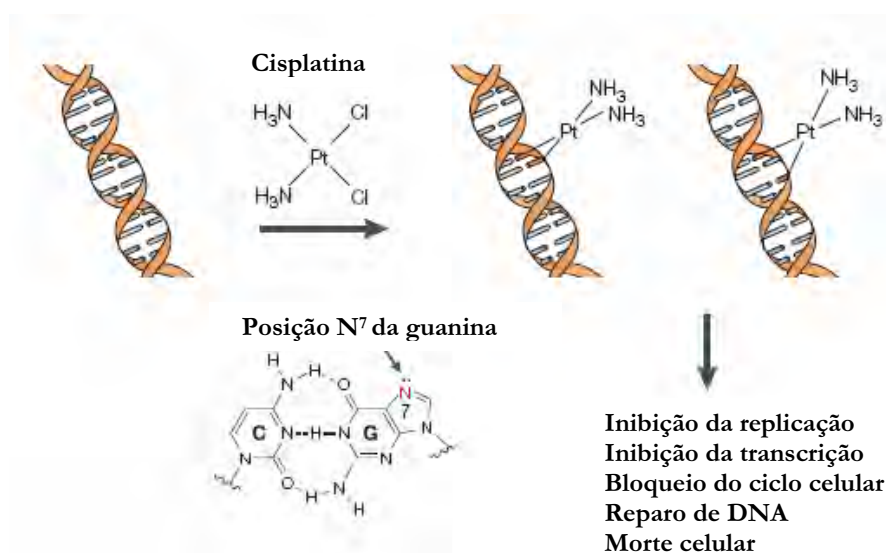


Figura 2. Formação e efeito dos aductos de cisplatina (adaptado de Wang & Lippard, 2005).

Outro agente quimioterápico, a gencitabina (2',2'-difluorodeoxicitidina; Figura 3), tem apresentado resultados promissores com relação à sua atividade sobre vários tipos de tumores sólidos, entre os quais, mama, cabeça e pescoço, ovário, pulmão, pâncreas e bexiga (Doyle et al., 2001; Sugiyama et al., 2007). Dessa maneira, essa droga passou a ser bastante estudada com relação à sua ação sobre o câncer de bexiga, demonstrando-se segura para uso em pacientes com CCT (Moore et al., 1997; Stadler et al., 1997; Bellmunt et al., 2000). Com toxicidade geralmente leve, a gencitabina é tolerada mesmo por pacientes idosos. Seus principais efeitos colaterais incluem neutropenia, erupções cutâneas e edema periférico leve, sendo os efeitos graves como mielosupressão, raramente observados (Stadler et al., 1997; Bokemeyer et al., 1999).

A gencitabina, após entrar na célula por mecanismo de transporte facilitado, é fosforilada pela quinase-deoxicitidina gerando nucleosídeos ativos difosfato (dFdCDP), que, por sua vez, inibem a ribonucleotídeo redutase e, consequentemente, reduzem a concentração de dATP, dCTP, dGTP e dTTP. O dFdCTP, segundo metabólito formado, inibe a atividade da DNA polimerase e compete com o dCTP para incorporação no DNA (Latz et al., 1998; Nagourney et al., 2000; Doyle et al., 2001). Estudo *in vitro* demonstrou que a gencitabina pode inibir a atividade da topoisomerase I, uma vez que células deficientes para essa enzima foram resistentes ao tratamento, contribuindo para a citotoxicidade da gencitabina (Pouquier et al., 2002).

Atualmente, o efeito sinérgico da combinação cisplatina/gencitabina tem sido considerado como “segundo” protocolo padrão para o carcinoma urotelial (von der Maase et al., 2000a; Suyama et al., 2009). von der Maase et al. (2000b) demonstrou que o tratamento utilizando cisplatina e gencitabina possui a mesma eficácia e menores efeitos tóxicos ao paciente do que o protocolo MVAC (metotrexato, vinblastina, adriamicina e cisplatina), padrão para tratamento do câncer de bexiga.

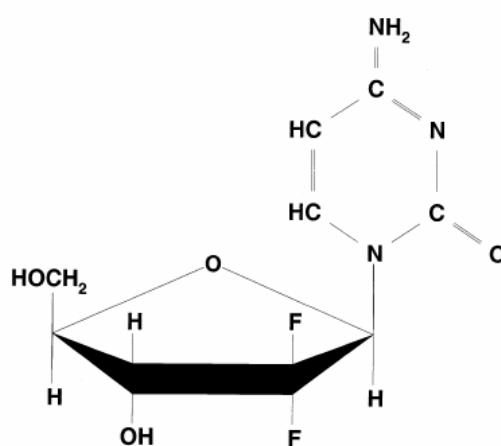


Figura 3. Estrutura química da gencitabina (2',2'-difluorodeoxicitidina) (adaptado de Vogelzang & Stadler 1999).

Mutagenicidade

O DNA está constantemente susceptível a lesões, caracterizadas por alterações na sua estrutura molecular. Tais lesões podem ocorrer “espontaneamente”, ou serem geradas por produtos do metabolismo celular ou por agentes ambientais (Hoeijmakers, 2001; Pages & Fuchs, 2002), e podem ser estruturalmente distintas dependendo do agente mutagênico indutor. Dentre os principais tipos de alterações no DNA estão as quebras de

fitas (induzidas, por exemplo, pelas radiações ionizantes, UV, bleomicina, etc), os dímeros de pirimidina (induzidos por UV de comprimento de onda curto), as alquilações de base (agentes alquilantes), as ligações cruzadas ou *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína (induzidas por agentes alquilantes polifuncionais e UV de comprimento de onda longo) e as intercalações (induzidas por agentes intercalantes como a acridina e a proflavina). No entanto, as células possuem mecanismos de defesa extremamente eficientes que garantem a integridade do genoma. Destacam-se entre eles os sistemas de reparo do DNA que podem ocorrer por excisão de bases (*Base Excision Repair* - BER), por excisão de nucleotídeos (*Nucleotide Excision Repair* - NER), por correção do pareamento errôneo de bases (*Mismatch Repair* - MMR), por recombinação homóloga (*Homologous Recombination* - HR), por junção de extremidades não homólogas (*Non-Homologous End Joining* - NHEJ), dentre outros (Collins, 1998; Benhamou & Sarasin, 2000, Joseph et al., 2005). No entanto, quando a extensão dos danos na molécula for grande, será desencadeada uma cascata de sinalização que poderá levar a célula à senescência ou morte (Costa & Menck, 2004). Contudo, caso esses mecanismos de defesa não sejam eficazes as lesões genômicas poderão ser fixadas após um ciclo de divisão celular e resultarem em mutações que podem envolver um ou poucos pares de bases (mutação de ponto), ou fragmentos e cromossomos inteiros (Maslov & Vijg, 2009).

Há vários testes moleculares e citogenéticos que permitem avaliar alterações no DNA ou nos cromossomos. Na sequência, serão descritas duas

das metodologias mais amplamente utilizadas na atualidade, o teste do cometa e o teste do micronúcleo, para a detecção, respectivamente, de danos primários no DNA (lesões genotóxicas) e de aberrações cromossômicas (mutagenicidade).

Teste do cometa

O teste do cometa ou eletroforese em gel de células individualizadas (SCGE) é um ensaio bastante utilizado para a avaliação de danos genotóxicos devido à sua sensibilidade, necessidade de pequeno número de células, possibilidade de aplicação a qualquer população de células viáveis, mas não necessariamente em proliferação, rapidez e baixo custo quando comparado a outros testes (Collins et al., 2008).

Em 1978, Rydeberg & Johanson foram os primeiros a quantificarem danos no DNA de células individualizadas sob condições levemente alcalinas. Mais tarde, Ostling & Johanson (1984) introduzindo algumas modificações na metodologia, submeteram células lisadas a microeletroforese, para que o DNA danificado (fragmentos) migrasse para o ânodo devido à sua carga negativa. Em 1988, o uso de condições alcalinas (pH >13) de eletroforese, aumentou a sensibilidade do teste, permitindo a detecção de quebras de fita única e dupla e sítios álcali-lábeis no DNA (Singh et al., 1988).

Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são corpúsculos de cromatina envoltos por uma membrana nuclear, que se originam de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal das células filhas durante a divisão celular (Fenech et al., 1997; Fenech et al., 1999). A alta confiabilidade e o baixo custo do teste do MN têm contribuído para a sua ampla utilização em estudos *in vivo* e *in vitro* para avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos físicos e biológicos e seus possíveis mecanismos de ação (Salvadori et al., 2003; Bonassi et al., 2005; Holland et al., 2008).

Inicialmente, o uso do teste do micronúcleo se limitava a estudos *in vivo*, em células de medula óssea de roedores. Em 1985, Fenech & Morley utilizando um composto que bloqueava a citocinese, a citocalasina B (CtB), ampliaram a aplicação do teste para estudos *in vitro*. Nesse caso, o uso da CtB permitia o acúmulo de células binucleadas, o que garantia a passagem por apenas um ciclo de divisão após a exposição ao agente mutagênico (Fenech & Morley, 1985; Figura 4).

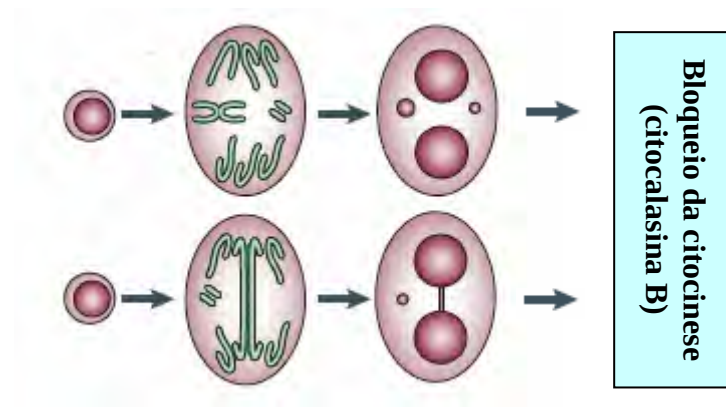


Figura 4. Origem e formação do micronúcleo e ponte nucleoplasmática (adaptado de Fenech, 2007).

II. OBJETIVOS

A resistência a drogas antineoplásicas e a recorrência tumoral permanecem entre os maiores obstáculos na quimioterapia do câncer de bexiga. Deste modo, torna-se relevante investigar os mecanismos de ação dos agentes antineoplásicos, a fim de estabelecer estratégias terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas para o pacientes. Nesse contexto, portanto, os objetivos do presente estudo foram:

Gerais

- avaliar o potencial toxicogenético da cisplatina e da gencitabina em células de carcinoma de bexiga de diferentes graus e *status* do gene *TP53*.

Específicos

- avaliar, pelo teste do cometa, a habilidade dos agentes antineoplásicos em induzir danos primários no DNA (quebras de fita simples e duplas e sítios álcali lábeis);
- investigar, por meio do teste do micronúcleo, os efeitos mutagênicos (clastogênicos e aneugênicos) da cisplatina e gencitabina;
- correlacionar os níveis de danos genotóxicos e mutagênicos

- avaliar a relação entre os danos genéticos induzidos pelos agentes quimioterápicos e o grau do tumor;
- avaliar a relação entre o status do gene *TP53* e os níveis de danos genotóxicos

III. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens celulares e agentes antineoplásicos

As linhagens celulares RT4 (tumor de baixo grau; gene *TP53* selvagem), 5637 (tumor de alto grau; gene *TP53* mutado) e T24 (tumor de alto grau; gene *TP53* mutado) estabelecidas a partir de carcinoma de células transicionais de bexiga, foram adquiridas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil. A linhagem 5637 possui duas mutações no gene *TP53*, uma no códon 280 e outra no códon 72 (Cooper MJ et al., 1994; Rieger KM et al., 1995); a linhagem T24 possui um alelo do gene *TP53* com deleção da tirosina 126 (Cooper MJ et al., 1994); a linhagem RT4 não apresenta mutação (Cooper MJ et al., 1994). As linhagens celulares RT4 e T24 foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich - USA) e a linhagem 5637 foi cultivada em meio RPMI (Sigma-Aldrich - USA), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina, 1% de streptomicina, 1% kanamicina (Amresco – USA), e foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Os agentes antineoplásicos cisplatina e gencitabina (Gemzar) foram adquiridos, respectivamente, da Sigma-Aldrich (USA) e do Laboratório Edi Lilly (Brasil). Para as diluições foi utilizada água ultrapura (Milli-Q).

Genotoxicidade (teste do cometa)

Para a avaliação da genotoxicidade dos agentes antineoplásicos cisplatina e gencitabina, foram cultivadas aproximadamente 2×10^4

células/poço (placas de 12 poços) para cada concentração a ser testada das drogas. Após 24 horas, tempo necessário para estabilização da cultura, os agentes antineoplásicos foram acrescentados ao meio de cultura nas concentrações de 0,5, 1 ou 2,5 μM de cisplatina; 0,78, 1,56 ou 3,12 μM de gencitabina; ou com as combinações 0,5 μM de cisplatina + 0,78 μM de gencitabina, 1 μM de cisplatina + 1,56 μM de gencitabina, ou 2,5 μM de cisplatina + 3,12 μM de gencitabina. Essas concentrações foram determinadas em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório (da Silva et al, 2010). As células foram coletadas 6 e 24 horas após o início dos tratamentos para a realização do teste do cometa (Figura 5). Todos os experimentos foram feitos em triplicatas.

O teste do cometa foi conduzido conforme a metodologia descrita por Singh et al. (1988) e Tice et al. (1991). Após a tripsinização, as células de cada poço foram transferidas para um microtubo de 1,5 ml, previamente identificado, que foi posteriormente centrifugado a 56 x g, por 3 minutos. O sobrenadante foi removido, foram adicionados em cada microtubo 100 μl de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (37°C), e a suspensão celular colocada sobre uma lâmina de microscópio previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Em seguida, a lâmina foi deixada à temperatura de 4°C, por 10 minutos, para solidificação da agarose e, então, imersa em solução de lise (2,5M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 1% de N lauroil sarcosinato, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO), na qual

permaneceu por aproximadamente 48 horas. Após esse período, a lâmina foi colocada em solução de PBS por 5 minutos e, em seguida, em uma cuba horizontal de eletroforese, onde permaneceu em tampão alcalino (NaOH 10 N, 200 EDTA 200 mM, pH > 13) a 4° C por 20 minutos. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 minutos. Após a corrida de eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M de Tris-HCL, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto. Para a coloração dos nucleóides foi utilizado o *Sybr Gold* (1:10.000 – Invitrogen - USA). Foram analisados 100 nucleóides por tratamento (50 por lâmina), em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay II – Perceptive Instruments, UK*), em aumento de 200x. O parâmetro utilizado para a mensuração dos danos no DNA foi o *tail intensity* (% DNA na cauda do cometa).

Como controle positivo da corrida de eletroforese foram utilizadas células 5637 ou T24 tratadas com peróxido de hidrogênio, respectivamente nas concentrações de 10µM e 15µM e células RT4 tratadas com metil metano sulfonato (MMS) na concentração de 14µM.

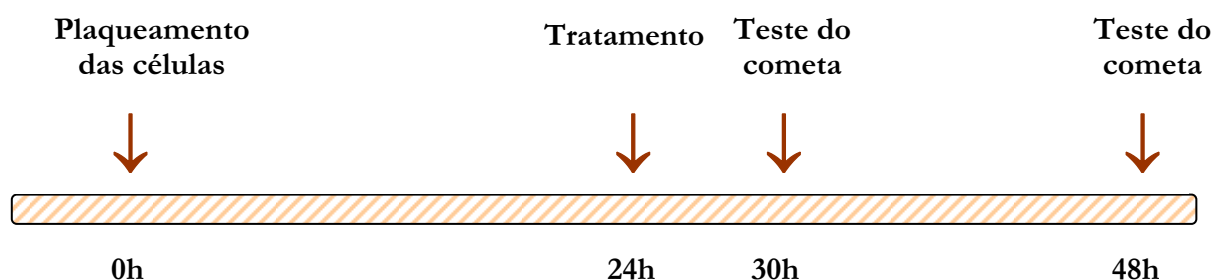


Figura 5. Protocolo de tratamento para o teste do cometa.

Mutagenicidade (teste do micronúcleo)

O teste do micronúcleo foi conduzido apenas para as linhagens 5637 e T24. Para a realização dos experimentos, aproximadamente 1×10^6 células foram semeadas em placas de *Petri* (100mm x 20mm) para cada tipo de tratamento a ser testado. Após a estabilização da cultura (24 horas), os agentes antineoplásicos foram acrescentados ao meio de cultura nas mesmas concentrações descritas para o teste do cometa. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas. Após 6 horas, os antineoplásicos foram removidos, foi adicionada a citocalasina B ($3\mu\text{g}/\text{ml}$) e as células permaneceram na estufa a 37°C e 5% de CO_2 , por 28 horas (Figura 6). Posteriormente, as células foram transferidas para um tubo de ensaio de 15 ml previamente identificado, e centrifugadas a 93 g por 8 minutos. O sobrenadante foi removido e foram adicionados, vagarosamente, 5 ml de solução hipotônica gelada (KCL 0,075 M) e novamente centrifugadas a $93 \times \text{g}$ por 5 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi descartado, o conteúdo do tubo foi levemente agitado e 5 ml de solução fixadora (metanol/ácido acético 5:1) recém-preparada foram acrescentados. Para auxiliar na preservação do citoplasma, 3 gotas de formoldeído foram acrescentadas, procedendo-se a centrifugação ($93 \times \text{g}$ por 5 minutos). Ao final desse processo, o sobrenadante foi parcialmente descartado, restando aproximadamente 1 ml no tubo, que foi levemente agitado e gotejado sobre lâminas limpas e pré-aquecidas em chapa quente. Como controle positivo foram utilizadas células 5637 e T24 tratadas com

doxorubicina (0,4µg/ml) por 2 horas. As células foram coradas em solução de Giemsa 5%, por 5 minutos e analisadas em microscópio óptico de luz, em aumento de 400x, de acordo com os critérios propostos por Fenech (2000).

O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado de acordo com Eastmond & Tucker (1989), utilizando-se a seguinte fórmula: $IDN = M1 + 2 (M2) + 3 (M3) + 4 (M4) / N$; M1 – M4: número de células com, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 núcleos; N: número total de células analisadas.

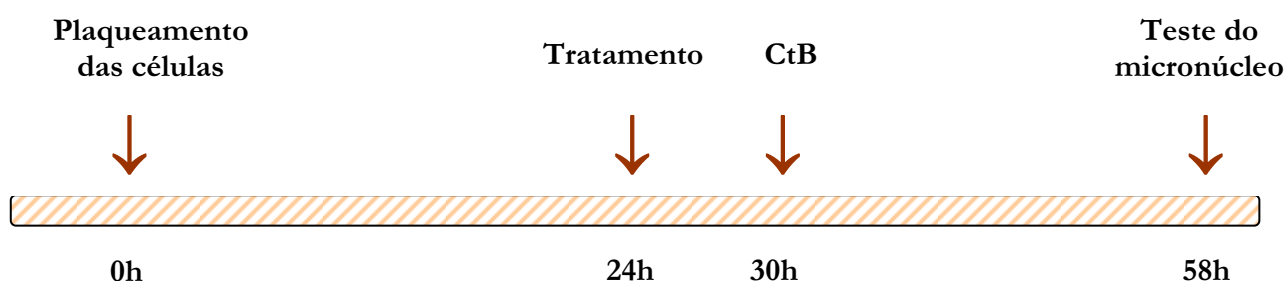


Figura 6. Protocolo de tratamento para o teste do micronúcleo. CtB = citocalasina B

Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o *software* SAS, v.9.2. Os dados obtidos pelo teste do cometa foram comparados por análise fatorial considerando os efeitos tempo e concentração. Devido à distribuição não-normal dos dados, as análises foram feitas com base na distribuição gama. Para o teste do micronúcleo, a comparação entre os tratamentos foi feita pela distribuição binomial. Para a análise do IDN foi utilizada a análise de variância a um critério (*one-way* ANOVA).

IV. RESULTADOS

As Tabelas I, II e III e Figuras 7, 8 e 9 mostram a extensão de danos no DNA (*tail intensity*) detectada, respectivamente, nas linhagens de carcinoma de bexiga RT4 (tumor de baixo grau; gene *TP53* selvagem), 5637 (tumor de alto grau; gene *TP53* mutado) e T24 (tumor de alto grau; gene *TP53* mutado), após os tratamentos com as drogas antineoplásicas cisplatina, gencitabina ou com a combinação de ambas.

Com relação ao tratamento com a cisplatina, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas na linhagem RT4, em nenhuma das concentrações (0,5, 1 e 2,5 μM) e tempos testados (6 e 24 h). Na linhagem 5637 foi observado aumento significativo de lesões no DNA para as três concentrações (0,5, 1 e 2,5 μM) no tempo de 6 h e somente para a menor concentração (0,5 μM) no tempo de 24 h, quando comparados aos seus respectivos controles negativos. O nível de danos induzidos pela concentração de 0,5 μM no tempo de 24 h, foi maior, também, que aqueles induzidos pelas concentrações de 1 e 2,5 μM . Na linhagem T24, foi detectada diferença significativa para a concentração de 0,5 μM , quando comparada a de 1 μM no tempo de 6 h e para a concentração de 1 μM quando comparada à concentração de 2,5 μM , tanto no tempo de 6h quanto no de 24h. Foram também observadas diferenças significativas para as concentrações de 1 e 2,5 μM no tempo de 6h, quando comparadas ao tratamento de 24 h.

Nos diferentes protocolos de tratamento com a gencitabina na linhagem RT4 não foram observadas diferenças significativas de danos no DNA, quando comparados aos controles negativos. Nas linhagens 5637 e T24 (*TP53* mutado), foram observados aumentos significativos de danos para todas as concentrações testadas, nos tempos de 6 e 24 h, exceto para a concentração de 0,78 μM no tempo de 6 h na linhagem 5637. Foram detectados, também, aumentos significativos na linhagem 5637 no tempo de 24 h, quando se comparou as concentrações de 0,78 e de 1,56 μM com a concentração de 3,12 μM . No que se refere à linhagem T24, tempo de 6 e 24 h, todas as concentrações apresentaram diferenças quando comparadas entre si, exceto a concentração de 0,78 e 3,12 μM , no tempo de 24 h. Quando comparados os dois momentos de coleta (6 e 24 h), foi observado diferença significativa na linhagem 5637 nas concentrações de 0,78 e 3,12 μM .

Nos tratamentos com a combinação das drogas cisplatina e gencitabina, na linhagem com o gene *TP53* selvagem (RT4), foram observados aumentos significativos de danos em relação ao controle negativo somente no tempo de 24 h, para todas as concentrações testadas. Foi também detectada diferença significativa quando se comparou os níveis de danos no DNA induzidos pela combinação 1 μM cisplatina + 1,56 μM gencitabina nos tempos de 6 h e 24. No tempo de 6 h, a combinação 0,5 cisplatina + 0,78 μM gencitabina mostrou diferença estatística quando comparada com a combinação 1 μM cisplatina + 1,56 μM de gencitabina. Para as linhagens com o *TP53* mutado, os resultados

mostraram aumentos estatisticamente significativos de danos nos dois momentos após os tratamentos, exceto para a combinação 0,5 cisplatina + 0,78 μ M gencitabina no tempo de 6 h na linhagem 5637. Quando foram feitas comparações entre as combinações, observaram-se diferenças significativas na linhagem 5637 no tempo de 6 h e 24 h para as combinações de 0,5 μ M cisplatina + 0,78 μ M gencitabina e 1 μ M cisplatina + 1,56 μ M de gencitabina e também para as combinações de 0,5 μ M cisplatina + 0,78 μ M gencitabina e 2,5 μ M cisplatina + 3,12 μ M gencitabina; para a linhagem T24, foram encontradas diferenças significativas nos tempos de 6 e 24 h em todas as combinações, exceto para as combinações de 1 μ M cisplatina + 1,56 μ M gencitabina e 2,5 μ M cisplatina + 3,12 μ M gencitabina no tempo de 6 horas e 0,5 μ M cisplatina + 0,78 μ M gencitabina e 1 μ M cisplatina + 1,56 μ M gencitabina no tempo de 24 horas. Em relação aos tempos, foi observado aumento de danos no DNA para todas as combinações nas linhagens com o gene TP53 mutado.

Tabela I. Danos no DNA (*tail intensity*) em células de carcinoma de bexiga – linhagem RT4, tratadas com cisplatina e/ou gencitabina.

<i>Quimioterápicos</i>	<i>Concentrações (μM)</i>	<i>Tempos de coleta (após tratamento)</i>	
		6 horas	24 horas
Cisplatina	Controle Negativo	13,49 $\pm$ 16,40	16,94 $\pm$ 20,17
	0,5	15,79 $\pm$ 20,26	12,81 $\pm$ 15,21
	1,0	12,89 $\pm$ 15,91	12,98 $\pm$ 17,76
	2,5	16,00 $\pm$ 17,08	12,90 $\pm$ 15,31
Gencitabina	Controle Negativo	16,76 $\pm$ 19,75	17,14 $\pm$ 16,93
	0,78	14,97 $\pm$ 18,03	22,62 $\pm$ 21,25 ^{bc*}
	1,56	14,82 $\pm$ 19,75	15,22 $\pm$ 19,07
	3,12	18,10 $\pm$ 20,41	14,39 $\pm$ 16,95
Drogas combinadas	Controle Negativo	16,98 $\pm$ 19,01	10,31 $\pm$ 16,01
	0,5 + 0,78	18,59 $\pm$ 21,00 ^b	19,07 $\pm$ 18,43 ^a
	1,0 + 1,56	13,71 $\pm$ 17,82	22,98 $\pm$ 24,67 ^{a*}
	2,5 + 3,12	18,21 $\pm$ 22,40	18,77 $\pm$ 22,66 ^a
Controle Positivo (MMS)	14	44,76 $\pm$ 26,96 ^a	

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. a: $p < 0,05$ em relação ao controle negativo; b: $p < 0,05$ em relação a concentração intermediária; c: $p < 0,05$ em relação a maior concentração; *: $p < 0,05$ em relação ao tratamento de 6 horas.

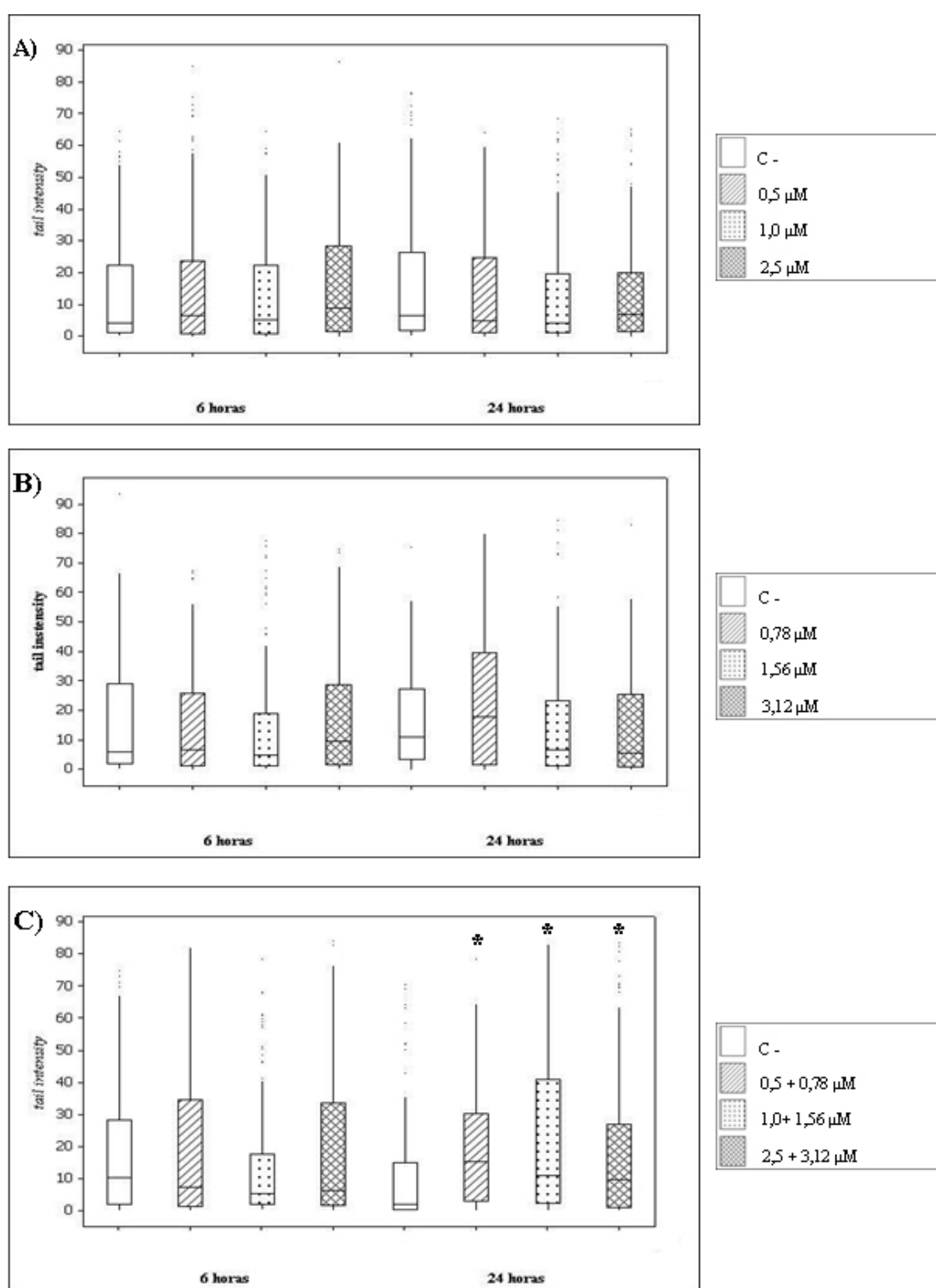


Figura 7. Danos no DNA (*tail intensity*) na linhagem de carcinoma de bexiga RT4 após tratamento com: A) cisplatina B) gencitabina e C) drogas combinadas (cis + gen);
* P < 0,01 com relação ao respectivo controle negativo.

Tabela II. Danos no DNA (*tail intensity*) em células de carcinoma de bexiga – linhagem 5637, tratadas com cisplatina e/ou gencitabina.

Quimioterápicos	Concentrações (μM)	Tempos de coleta (após tratamento)	
		6 horas	24 horas
Cisplatina	Controle Negativo	7,48 $\pm$ 10,34	11,19 $\pm$ 12,06
	0,5	10,72 $\pm$ 12,75 ^a	17,67 $\pm$ 16,14 ^{abc*}
	1,0	10,67 $\pm$ 12,97 ^a	11,45 $\pm$ 13,30
	2,5	11,75 $\pm$ 13,43 ^a	9,49 $\pm$ 11,27
Gencitabina	Controle Negativo	8,16 $\pm$ 10,58	10,69 $\pm$ 14,23
	0,78	10,72 $\pm$ 12,85	16,71 $\pm$ 15,05 ^{ac*}
	1,56	14,08 $\pm$ 14,88 ^a	14,64 $\pm$ 16,62 ^{ac}
	3,12	13,75 $\pm$ 13,67 ^a	23,29 $\pm$ 19,23 ^{a*}
Drogas combinadas	Controle Negativo	8,63 $\pm$ 11,36	10,01 $\pm$ 13,61
	0,5 + 0,78	9,65 $\pm$ 11,01 ^{bc}	16,49 $\pm$ 12,75 ^{abc*}
	1,0 + 1,56	13,16 $\pm$ 13,66 ^a	27,05 $\pm$ 20,58 ^{a*}
	2,5 + 3,12	13,93 $\pm$ 14,05 ^a	25,52 $\pm$ 21,27 ^{a*}
Controle Positivo (H ₂ O ₂)	10	16,59 $\pm$ 17,59 ^a	

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. a: $p < 0,05$ em relação ao controle negativo; b: $p < 0,05$ em relação a concentração intermediária; c: $p < 0,05$ em relação a maior concentração; *: $p < 0,05$ em relação ao tratamento de 6 horas.

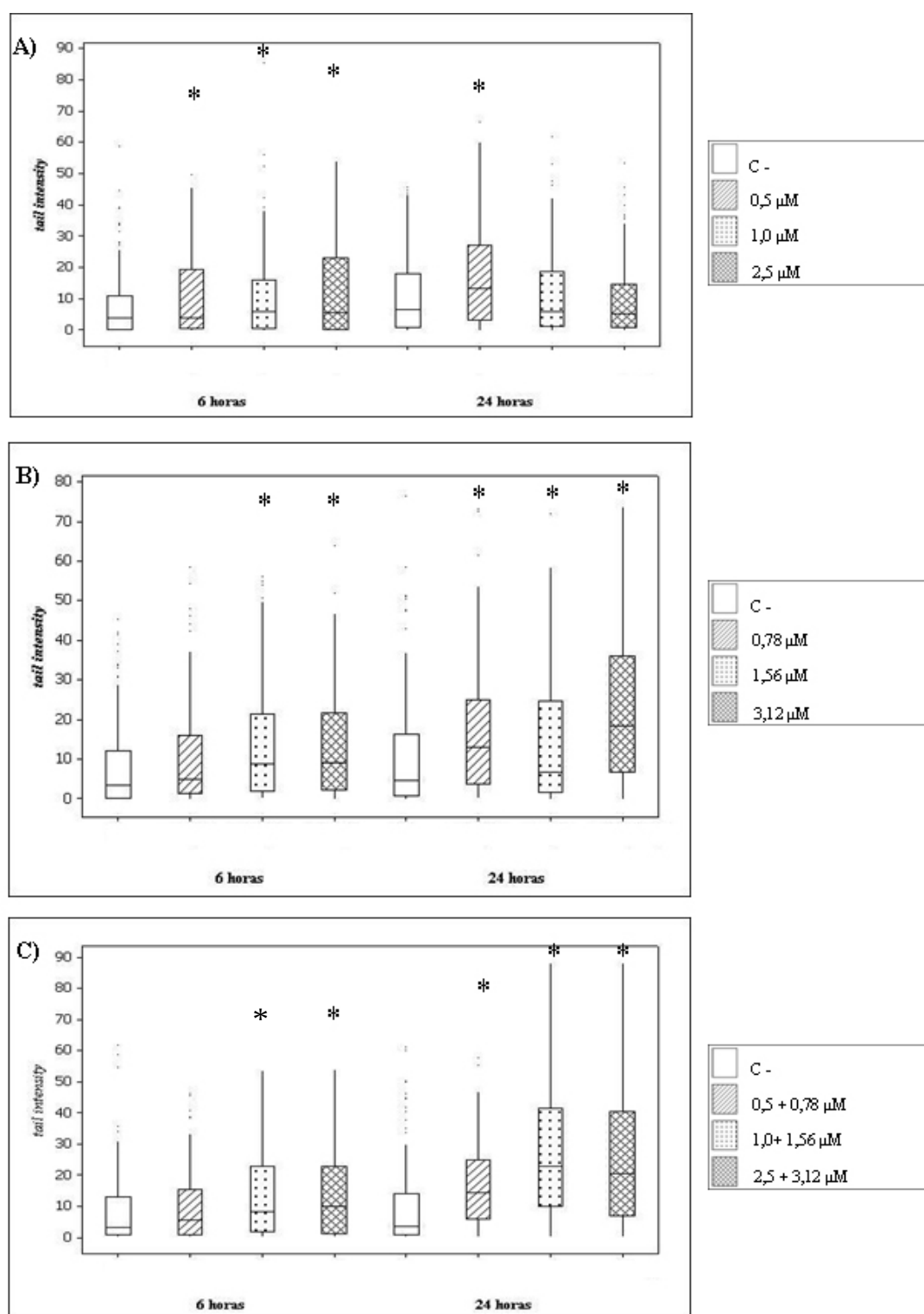


Figura 8. Danos no DNA (*tail intensity*) na linhagem de carcinoma de bexiga 5637 após tratamento com: A) cisplatina B) gentamicina e C) drogas combinadas (cis + gen); * $P < 0,05$ com relação ao respectivo controle negativo.

Tabela III. Danos no DNA (*tail intensity*) em células de carcinoma de bexiga – linhagem T24, tratadas com cisplatina e/ou gencitabina.

<i>Quimioterápicos</i>	<i>Concentrações (μM)</i>	<i>Tempos de coleta (após tratamento)</i>	
		6 horas	24 horas
Cisplatina	Controle Negativo	8,25 $\pm$ 9,68	8,00 $\pm$ 9,46
	0,5	6,90 $\pm$ 9,57 ^b	8,42 $\pm$ 10,67
	1,0	10,02 $\pm$ 11,49 ^c	6,33 $\pm$ 9,17 ^{c*}
	2,5	6,84 $\pm$ 8,70	10,41 $\pm$ 11,08 [*]
Gencitabina	Controle Negativo	7,35 $\pm$ 9,99	8,88 $\pm$ 11,25
	0,78	19,66 $\pm$ 17,08 ^{abc}	22,42 $\pm$ 14,08 ^{ab}
	1,56	15,64 $\pm$ 11,70 ^{ac}	17,59 $\pm$ 10,91 ^{ac}
	3,12	25,18 $\pm$ 19,33 ^a	27,05 $\pm$ 19,19 ^a
Drogas combinadas	Controle Negativo	5,80 $\pm$ 9,36	9,10 $\pm$ 11,39
	0,5 + 0,78	13,95 $\pm$ 11,81 ^{abc}	25,02 $\pm$ 16,00 ^{ac*}
	1,0 + 1,56	21,08 $\pm$ 15,46 ^a	33,81 $\pm$ 17,69 ^{ac*}
	2,5 + 3,12	20,70 $\pm$ 13,86 ^a	42,65 $\pm$ 15,90 ^{a*}
Controle Positivo (H₂O₂)	15	27,07 $\pm$ 24,40 ^a	

Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. a: $p < 0,05$ em relação ao controle negativo; b: $p < 0,05$ em relação a concentração intermediária; c: $p < 0,05$ em relação a maior concentração; *: $p < 0,05$ em relação ao tratamento de 6 horas.

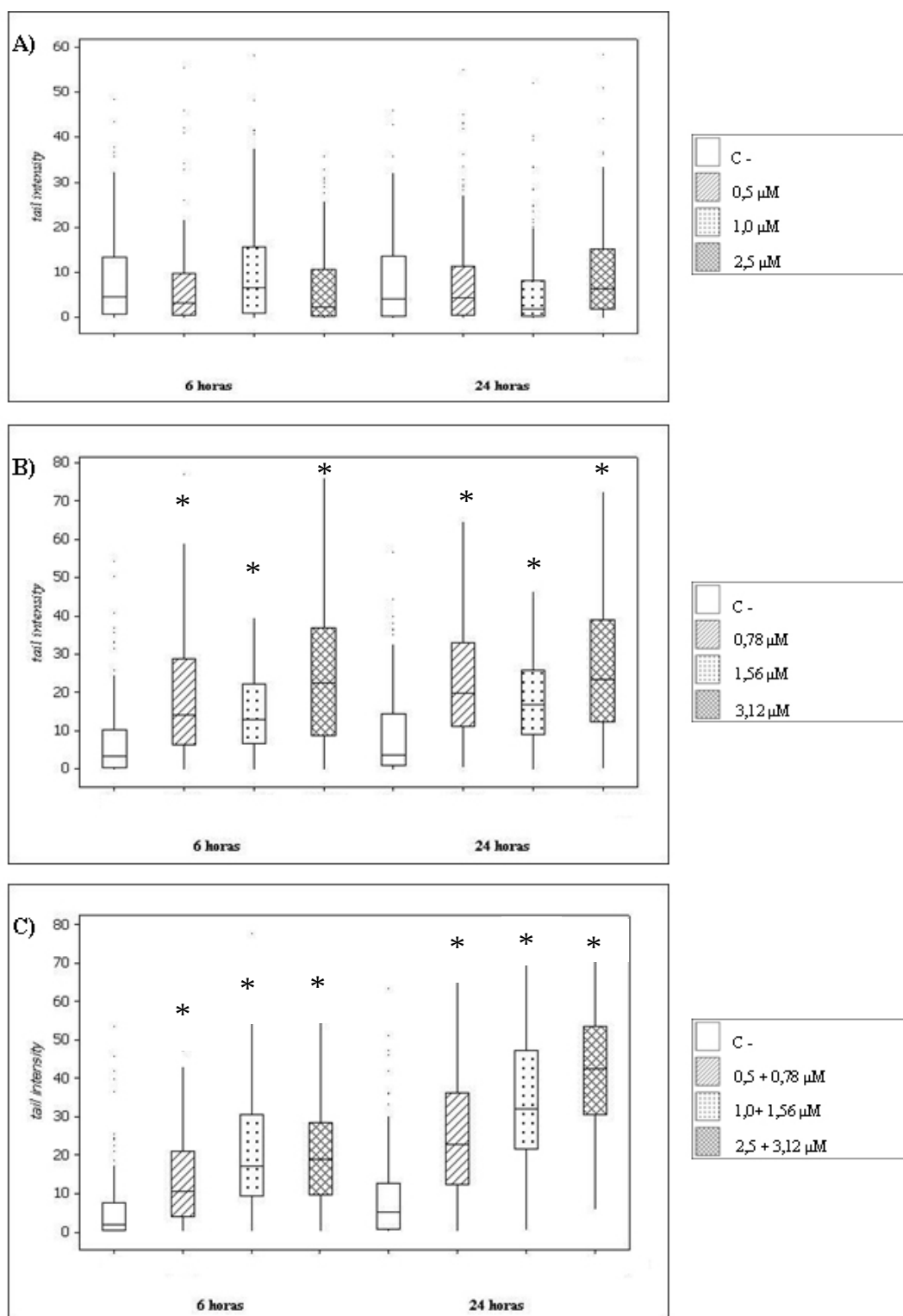


Figura 9. Danos no DNA (*tail intensity*) na linhagem de carcinoma de bexiga T24 após tratamento com: A) cisplatina B) gencitabina e C) drogas combinadas (cis + gen); * $P < 0,05$ com relação ao respectivo controle negativo.

Nas tabelas IV e V estão apresentados os resultados do teste do micronúcleo, respectivamente para as linhagens 5637 (tumor de alto grau; gene *TP53* mutado) e T24 (tumor de alto grau; gene *TP53* mutado), após o tratamento com o agente antineoplásico cisplatina. Para a linhagem 5637, os dados não mostraram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos tratamentos realizados. Para a linhagem T24 foi observado aumento significativo apenas para a concentração de 0,5 μ M. Nas duas linhagens, o controle positivo mostrou diferença significativa quando comparado ao seu respectivo controle negativo.

Tabela IV. Frequência de micronúcleo (MN) em células 5637 tratadas com cisplatina

Tratamento	Concentração de cisplatina (μ M)	Número de MN	MN/1000 BN [#] média $\pm$ DP
Controle negativo		17	8,5 $\pm$ 0,7
Cisplatina	0,5	25	12,5 $\pm$ 4,9
	1,0	24	12,0 $\pm$ 4,2
	2,5	26	13 $\pm$ 0
Controle positivo		40	20,0 $\pm$ 2,8*

[#] Média $\pm$ DP de dois experimentos independentes; BN – células binucleadas; * P<0,05 em relação ao controle negativo; controle positivo: 0,4 μ g/ml doxorubicina

Tabela V. Frequência de micronúcleo (MN) em células T24 tratadas com cisplatina

Tratamento	Concentração de cisplatina (μM)	Número de MN	MN/1000 BN [#] média $\pm$ DP
Controle negativo		8	4,0 $\pm$ 1,4
Cisplatina	0,5	20	10,0 $\pm$ 1,4*
	1,0	17	8,5 $\pm$ 2,1
	2,5	17	8,5 $\pm$ 4,9
Controle positivo		38	19 $\pm$ 8,4*

[#] Média $\pm$ DP de dois experimentos independentes; BN – células binucleadas; * P<0,05 em relação ao controle negativo. Controle positivo: 0,4 μg /ml doxorrubicina

As Tabelas VI e VII apresentam o Índice de Divisão Nuclear (IDN), respectivamente nas linhagens 5637 e T24, após os tratamentos com a gencitabina ou com a combinação de gencitabina e cisplatina. Os resultados mostram diferenças estatisticamente significativas para todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo, nas duas linhagens.

Tabela VI. Índice de divisão nuclear da linhagem 5367 após tratamentos com a gencitabina e com a combinação cisplatina (CIS) e gencitabina (GEN)

Tratamento	Concentração (μM)	Número de células analisadas	Média IDN $\pm$ DP [#]
Controle negativo		2000	1,96 $\pm$ 0,001
Gencitabina	0,78	2000	1,02 $\pm$ 0,000*
	1,56	2000	1,01 $\pm$ 0,004*
	3,12	2000	1,01 $\pm$ 0,002*
	0,5 + 0,78	2000	1,05 $\pm$ 0,053*
Drogas combinadas (CIS + GEN)	1,0 + 1,56	2000	1,01 $\pm$ 0,004*
	2,5 + 3,12	2000	1,01 $\pm$ 0,002*

[#] Média $\pm$ DP de dois experimentos independentes; * P<0,05 em relação ao controle negativo para todos os tratamentos.

Tabela VII. Índice de Divisão Nuclear (IDN) da linhagem T24 após tratamentos com a gencitabina e com a combinação cisplatina (CIS) e gencitabina (GEN).

Tratamento	Concentração (μM)	Número de células analisadas	Média IDN ± DP [#]
Controle negativo		2000	1,94 ± 0,004
	0,78	2000	1,01 ± 0,006*
Gencitabina	1,56	2000	1,01 ± 0,002*
	3,12	2000	1,02 ± 0,006*
	0,5 + 0,78	2000	1,01 ± 0,002*
Drogas combinadas (CIS + GEN)	1,0 + 1,56	2000	1,02 ± 0,009*
	2,5 + 3,12	2000	1,01 ± 0,013*

Média ± DP de dois experimentos independentes; * P<0,05 em relação ao controle negativo para todos os tratamentos.

V. DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares responsáveis pela patogênese do câncer de bexiga têm sido extensivamente estudados com o objetivo de prevenir a doença e buscar estratégias mais eficazes de tratamento (Habuchi et al., 2005; Sanchez-Carbayo et al., 2002). Sabe-se que mutações no gene *TP53* são eventos centrais da carcinogênese urotelial e têm sido associadas à progressão tumoral (Nishiyama et al., 2008), entretanto, seu papel na resposta à quimioterapia ainda não é bem entendida (Kielb et al., 2001). Hipoteticamente, as células mutadas para o gene *TP53* seriam mais resistentes a drogas antineoplásicas por causa da atividade do *TP53* no controle da apoptose (Kim et al., 2009). Sabe-se que danos no DNA estimulam uma resposta rápida do gene *TP53* que inibe a progressão do ciclo celular em G1-S e sinaliza para a ativação dos sistemas de reparo levando à sobrevivência celular (Sengupta et al., 2005; Nishiyama et al., 2008).

No presente estudo, três linhagens de células de câncer de bexiga - RT4 (*TP53* tipo selvagem), 5637 e T24 (ambos com o gene *TP53* mutado) - foram utilizadas para avaliar a relação entre o *status* do gene *TP53* e os danos primários no DNA (efeito genotóxico detectado pelo teste do cometa) induzidos pelas drogas antitumorais cisplatina e gencitabina. Para se avaliar o potencial mutagênico (teste do micronúcleo) desses agentes foram utilizadas duas linhagens celulares com o gene *TP53* mutado (5637 e T24).

O teste do cometa é amplamente utilizado para avaliar danos primários no DNA em estudos de identificação de compostos genotóxicos, biomonitoramento de populações e ecotoxicidade, em uma ampla variedade de tipos celulares. A avaliação dos possíveis efeitos genotóxicos de compostos antineoplásicos em células tumorais, por exemplo, pode fornecer informações importantes sobre o mecanismo de ação dessas drogas, especialmente no que diz respeito à sensibilidade celular a diferentes protocolos de tratamento (McKenna et al., 2008). O teste do micronúcleo, por sua vez, é um ensaio citogenético que permite avaliar danos cromossômicos em populações expostas a agentes mutagênicos. A alta confiabilidade e o baixo custo dessa técnica têm contribuído para o seu sucesso e ampla utilização como um indicador de mutagenicidade tanto em estudos *in vivo* como *in vitro* (Bonassi et al., 2006; Bonassi et al., 2010).

Para o câncer de bexiga, protocolos quimioterápicos que incluem a combinação das drogas methotrexate, vinblastine, doxorubicina e cisplatina (MVAC) têm sido bastante utilizados e avaliados. Nos últimos anos, a gencitabina também foi incluída nos esquemas de tratamento dos tumores uroteliais (Bellmut et al., 2006). Von der Maase et al. (2000b) mostraram em pacientes com câncer de bexiga avançado que o protocolo combinado de cisplatina e gencitabina apresenta eficácia similar ao MVAC, mas com tolerabilidade superior e menor toxicidade. Portanto, com base na interação sinérgica entre a cisplatina e a gencitabina, o uso simultâneo dessas drogas

vem sendo considerado como alternativa ao MVAC (von der Maase et al., 2005; Bellmut et al., 2006).

A cisplatina é um composto que se liga ao DNA formando ligações cruzadas (*crosslinks*) intra e intercadeia, sendo essas últimas as menos freqüentes, mas as mais citotóxicas (Zhang et al., 2009; Brozovic et al., 2009). No teste do cometa, nossos resultados mostraram que a cisplatina, nas três concentrações testadas e avaliadas 6 horas após o tratamento, induziu aumento estatisticamente significativo de danos no DNA somente na linhagem 5637, que possui o gene *TP53* mutado. Quando o efeito foi avaliado 24 horas após o tratamento, somente a menor concentração mostrou-se genotóxica. Nas células 5637, o gene *TP53* possui mutações pontuais nos códons 72 e 280 (*core domain*) que podem inibir completamente a função do gene, uma vez que a proteína (p53) produzida pode não atuar exercer sua atividade na regulação de outros genes (Cordon-Cardo et al., 1994).

Estudos sobre o gene *TP53* têm mostrado resultados conflitantes, uma vez que a resposta do gene varia de acordo com a presença ou não de mutação e com a localização desta (Prives & Manfredi, 2005). Sanchez-Carbayo et al. (2002) usando métodos *bootstrapping* para análise de dados de expressão gênica em larga escala, puderam agrupar as linhagens celulares de câncer de bexiga com base no *status* dos genes *TP53*, *RB* e *p16* (p53/pRB/INK4A). Os autores observaram, contudo, que as células que possuíam mutação no exon 8 (como é o caso das células 5637) não se

incluíam no agrupamento. Dessa maneira, foi sugerido que apesar do mecanismo p53/pRB/INK4A ser importante no desenvolvimento e progressão do câncer de bexiga, outros mecanismos estão também envolvidos e precisam ser ainda identificados. Estudo anterior realizado em nosso laboratório mostrou que a linhagem T24 (*TP53* mutado) apresentava perfil de expressão gênica mais semelhante à linhagem RT4 (*TP53* selvagem) do que à linhagem 5637 (*TP53* mutado), sugerindo que esta (5637) possui *background* genético muito diferente das outras duas linhagens. Além disso, as redes Bayesianas mostraram que nas linhagens 5637 e T24 o gene *TP53* interage com diversos outros genes, sugerindo que outros mecanismos além do *TP53*, podem estar associados ao fenótipo maligno (da Silva, 2009).

A ausência de efeito genotóxico observada nas linhagens celulares RT4 e T24 poderia, também, ser explicada pelo tipo de lesão induzida pela cisplatina. Dados apresentados na literatura (Pfuhler & Wolf, 1996; Merck & Speit, 1999) mostram que as ligações cruzadas induzidas no DNA por essa droga não são detectadas pelo teste do cometa, não podendo, portanto, ser mensuradas. O teste do cometa é uma técnica sensível para detectar uma variedade de lesões no DNA, entretanto, não é efetivo para detectar lesões induzidas por agentes que causam ligações cruzadas do tipo DNA-DNA e DNA-proteínas, as quais podem dificultar a migração do DNA na eletroforese (Merck & Speit, 1999). Assim sendo, pode-se sugerir que o efeito genotóxico da cisplatina detectado pelo teste do cometa na linhagem 5637, seria indicativo

da presença de outros tipos de lesões no DNA, provavelmente resultantes de processos relacionados às diferenças genéticas existentes nessa linhagem.

No teste do micronúcleo, nossos achados evidenciaram o aumento de alterações cromossômicas apenas na linhagem T24 e para a menor concentração da cisplatina. Apesar de não estatisticamente significativo, não se pode descartar das considerações biológicas a evidência do aumento na frequência de micronúcleo em ambas as linhagens com o gene *TP53* mutado e para todas as concentrações. Estudo realizado por Attia (2010) mostrou aumento significativo de micronúcleos em células de medula de camundongos, 24 horas após a administração da cisplatina. Alves et al. (2007) também demonstraram que a cisplatina induziu aumento de aberrações cromossômicas e do índice mitótico, em linfócitos de pacientes com hemoglobinopatias, evidenciando o potencial mutagênico da droga.

Por outro lado, a atividade da gencitabina é ainda pouco conhecida. Em nosso estudo, somente a linhagem *TP53* selvagem (RT4) não apresentou danos no DNA após os tratamentos. Este resultado reforça os achados que demonstram que em células *TP53* selvagem tratadas com gencitabina, os danos no DNA levam ao aumento da expressão do gene *TP53*, que resulta na ativação dos mecanismos de reparo (Bergman, et al., 2002). No caso das duas linhagens mutadas para o gene *TP53*, o efeito genotóxico detectado nos diferentes tempos de análise, evidencia a maior sensibilidade dessas células ao tratamento com a gencitabina. Entretanto, é importante destacar que esse

quimioterápico caracteriza-se por ser um análogo de nucleotídeo, que inibe a síntese de DNA e, dessa maneira, os efeitos do tratamento observados após longos períodos podem não estar relacionados ao status de *TP53*. Fencher et al. (2003) mostraram que a indução de apoptose após o tratamento com a gencitabina é independente do status de *TP53* em linhagens de carcinoma de células transicionais. Além disso, foi descrito que os efeitos da gencitabina não estavam relacionados ao status do gene *TP53* em células de epitélio de pulmão A549 (Paulwels et al., 2005).

Com relação ao potencial mutagênico da gencitabina, não foi possível realizar a avaliação pelo teste do micronúcleo nas linhagens utilizadas (5637 e T24). As células analisadas após o tempo de tratamento apresentavam-se mononucleadas, indicando o bloqueio do ciclo de divisão e, consequentemente, a impossibilidade de detecção, com precisão, dos danos cromossômicos induzidos pela droga. Dessa maneira, foi possível avaliar, apenas, o potencial citotóxico da gencitabina e não mutagênico. Para isso, utilizamos o índice de divisão nuclear (IDN) conforme sugerido por Fenech (2007). De acordo com esse autor, o cálculo do IDN permite avaliar o estado proliferativo das células viáveis e, portanto, pode ser utilizado como um indicador de efeito citostático. O menor valor, 1, observado para este índice, ocorre quando as células não conseguiram passar por um ciclo de divisão e se apresentam todas mononucleadas (como foi o caso do presente estudo). Caso todas as células tenham completado um ciclo de divisão nuclear, o valor do

IDN será 2. O valor de IDN será superior a 2 quando as células tiverem passado por mais de um ciclo de divisão. Nossos dados mostraram diferença estatisticamente significativa do valor do IDN em todas as concentrações testadas da gencitabina nas linhagens celulares *TP53* mutadas (5637 e T24), corroborando os resultados apresentados por Aydemir et al. (2005) que evidenciaram a diminuição do índice de replicação celular em cultura de linfócitos humanos, após o tratamento com a gencitabina. O mecanismo de ação sugerido para explicar tal inibição é pela incorporação da gencitabina na fita de DNA, competindo com a citosina, e, dessa maneira, inibindo a atividade da DNA polimerase (Jiang et al., 2000). Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, observamos o bloqueio do ciclo celular na fase G1 nas três linhagens celulares (RT4, 5637 e T24), independente do status do gene *TP53* (da Silva et al., 2010).

Quando analisamos os efeitos do tratamento simultâneo com a cisplatina e a gencitabina, foi observado aumento estatisticamente significativo de danos no DNA em todas as linhagens celulares, independente do *status* do gene *TP53*. Alguns autores mostram que essas duas drogas são ideais para o combinado devido a seus diferentes, mas complementares, mecanismos de ação. Como a gencitabina é incorporada em cada fita de DNA sintetizada, o uso combinado da cisplatina pode inibir o reparo de danos causados no DNA, resultando em aumento da citotoxicidade e morte celular (Moufarij et al., 2003). Em nosso estudo, foram observados resultados semelhantes, uma vez

que o tratamento com a gencitabina induziu efeito citostático nas linhagens *TP53* mutadas. Esses achados corroboram dados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa que mostraram o bloqueio do ciclo celular na fase G1 nas três linhagens celulares expostas à combinação cisplatina/gencitabina. Da mesma maneira, foram observadas baixas taxas de sobrevivência celular e clonogênica nessas linhagens após o tratamento combinado da drogas (da Silva et al., 2010), confirmando o efeito sinérgico dos dois agentes quimioterápicos. Outros estudos apresentados na literatura também relatam os efeitos favoráveis do uso simultâneo da cisplatina e gencitabina em pacientes com carcinoma de células transicionais uroteliais (Bellmunt & Albiol, 2001; von der Maase et al., 1999).

Finalizando, nossos resultados sugerem que o tratamento combinado cisplatina/gencitabina foi o mais efetivo em linhagens de carcinoma de células transicionais de bexiga, independente do status do *TP53*. No entanto, novas avaliações devem ser conduzidas no sentido de ampliar o entendimento sobre os mecanismos de ação dessas duas drogas isoladamente ou em combinação, a fim de definir estratégias de tratamento mais eficazes e com menores riscos secundários aos pacientes com câncer urotelial.

VI. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos dos agentes antineoplásicos cisplatina e gencitabina em linhagens celulares de carcinoma de bexiga (RT4 - tumor de baixo grau e gene *TP53* selvagem; 5637 - tumor de alto grau e gene *TP53* mutado; T24 - tumor de alto grau e gene *TP53* mutado) permitiram as seguintes conclusões:

- a cisplatina apresentou efeito genotóxico somente na linhagem celular 5637;
- a cisplatina induziu efeito mutagênico apenas na linhagem T24 quando utilizada em baixa concentração (0,5 μ M);
- o tratamento com gencitabina induziu danos no DNA apenas nas células com mutações no gene *TP53* (5637 e T24);
- o tratamento simultâneo cisplatina e gencitabina induziu danos no DNA nas três linhagens celulares, independente do *status* do gene *TP53*;
- os tratamentos com a gencitabina e com a combinação cisplatina/gencitabina induziram bloqueio no ciclo celular em linhagens com o gene *TP53* mutado;
- os efeitos genotóxicos da gencitabina são dependentes do *status* do gene *TP53*, enquanto os da cisplatina e do tratamento combinado das drogas não dependem do *status* do gene.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves OM, Martins PRJ, Dias FL, Burbano RMR, Bianchi MLP, Antunes LMG. Sensitivity to cisplatin-induced mutations and elevated chromosomal aberrations in lymphocytes from sickle cell disease patients. *Clin Exp Méd.* 2008;8:31–5.

Arai T, Sawabe M, Hosoi T, Tanaka N. Role of DNA repair systems in malignant tumor development in the elderly. *Geriatr Gerontol Int.* 2008;8(2):65–72.

Aydemir N, Celikler S, Bilaloglu R. In vitro genotoxic effect of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes. *Mutat res.* 2005;582:35-41

Baithun Si, Naase M, Blanes A, Diaz-Cano Sj. Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder: biological and clinical implications. *Virchows Arch.* 2001;438(3):289-97.

Bellmunt J, Albiol S. New chemotherapy combinations for advanced bladder cancer. *Curr Opin Urol.* 2001;11(5):517-22.

Bellmunt BJ, Guillem V, Paz-Ares L, González-Larriba JL, Carles J, Batiste-Alentorn E, et al. Phase I-II study of paclitaxel, cisplatin, and gemcitabine in advanced transitional-cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Oncol*. 2000;18:3247-55.

Bellmut J, Albiol S, Ramirez de Olano A, Pujadas J, Maroto P. On behalf the Spanish Oncology Genitourinary Group (SOGUG). Gemcitabine in the treatment of advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *Ann Oncol*. 2006;17(5):113-17.

Benhamou S, Sarasin A. Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat Res* 2000;462:149-58.

Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ. Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Res Updat*. 2002;5(1):19-33.

Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R, Tucker JD. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future perspectives. *Environ Mol Mutagen*. 2005;45:258-70.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007;28(3):625–31.

Bokemeyer C, Gerl A, Schoffski P, Harstrick A, Niederle N, Beyer J, et al. Gemcitabine in patients with relapsed or cisplatin-refractory testicular cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17:512-16.

Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist Updat*. 2005;8(3):131–46.

Brozovic A, Damrot J, Tsaryk R, Helbig L, Nikolova T, Hartig C et al. Cisplatin sensitivity is related to late DNA damage processing and checkpoint control rather than to the early DNA damage response. *Mutat Res*. 2009;670(1):32-41.

Castillo-Martin M, Domingo-Domenech J, Karni-Schmidt O, Matos T, Cordon-Cardo C. Molecular pathways of urothelial development and bladder tumorigenesis. *Urol Oncol*. 2010;28(4):401–408

Catto JWF, Meuth M, Hamdy FC. Genetic instability and transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int.* 2004;93(1):19-24.

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.* 2010;705:11–19.

Chester JD, Halla GD, Forsterb M, Protheroe AS. Systemic chemotherapy for patients with bladder cancer – current controversies and future directions. *Cancer Treat rev.* 2004;30:343-358.

Cho JM, Manandhar S, Lee HR, Park HM, Kwak MK. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett.* 2008;260(1-2):96–108.

Collins AR, Raslová K, Smorovská MP, Petrovská H, Ondrusova A, Vohnout B et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Rad Biol Méd* 1998;25:373-7.

Collins AR, Oscoz1 AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 2008;23(3):143-51.

Cooper MJ, Haluschak JJ, Johson D, Schwartz S, Morrison LJ, Lippa M, Hatzivassiliou G, Tan J. p53 mutations in bladder carcinoma cell lines. *Oncol Res.* 1994;6:569-79.

Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Saez GT, Oliva MR, Zhang ZF, Rosai J, Reuter VE, Pellicer A. p53 mutations in human bladder cancer: genotypic versus phenotypic patterns. *Int J Cancer* 1994;56:347–53

Costa RMA, Menck CFM. Genes de reparo de DNA. IN: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo; 2004. 43-55.

da Silva GN. Efeitos citotóxicos e toxicogenômicos dos antineoplásicos cisplatina e gencitabina em células de carcinoma de bexiga[tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina; 2009.

da Silva GN, Marcondes JPC, Camargo EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET, Salvadori DMF. Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. *Exp Biol Med.* 2010;235:814-24.

Doyle TD, Mornex F, McKenna WG. The clinical implications of gemcitabine radiosensitization. *Clin Cancer Res.* 2001;7(2):226–8.

Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy–inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 1989;13:34–43.

Ecke TH, Bartel P, Koch S, Rüttloff J, Theissig F. Chemotherapy with gemcitabine, paclitaxel, and cisplatin in the treatment of patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *Oncol Rep.* 2006;16(6):1381-8.

Esrig D, Spruck CH, Nichols PW, Chaiwun B, Steven K, Groshen S, et al. p53 nuclear protein accumulation correlates with mutations in the p53 gene, tumor grade, and stage in bladder cancer. *Am J Pathol.* 1993;143(5):1389-97.

Fechner G, Perabo FGE, Schmidt DH, Haase L, Ludwig E, Schueller H, et al. Preliminary evaluation of a radiosensitizing effect of gemcitabine in p53 mutant and p53 wild type bladder cancer cells. *Urology.* 2003;61(2):468–73.

Fenech M, Morley A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. *Cytobios.* 1985;43:233-46.

Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res.* 1997;392:11-8.

Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.*1999;428:271–83.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000;455:81-95.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature.* 2007;2:1084-104.

Fleshner N, Garland J, Moadel A, Herr H, Ostroff J, Trambert R, et al. Influence of smoking status on the disease-related outcomes of patients with tobacco-associated superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer.* 1999;86(11):2337-45.

Golka K, Wiese A, Assennato G, Bolt HM. Occupational exposure and urological câncer. *World J Urol.* 2004;21:382–91.

Gontijo AMMC, Elias FN, Salvadori DMF, Sartor MLC, Correa LA, Goldberg J, Trindade JCS, Camargo JLV. Single-cell gel (Comet) assay detects primary DNA damage in nonneoplastic urothelial cells of smokers and ex-smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:987-93.

Habuchi T, Marberger M, Droller MJ, Hemstreet III GP, Grossman BH, Schalken JA, et al. Prognostic markers for bladder cancer: International consensus panel on bladder tumor markers. *Urology.* 2005;66(6):64-74.

Hernandez S, Lopez-Knowles E, Loreta J, Kogevinas M, Jaramillo R, Amorós A, et al. FGFR3 and Tp53 mutations in T1G3 transitional bladder carcinomas: independent distribution and lack of association with prognosis. *Clin Cancer Res.* 2005;11(15):5444-50.

Hirao Y, Kim WJ, Fujimoto K. Environmental factors promoting bladder câncer. *Curr Opin Urol.* 2009;19(5):494–99.

Hisataki T, Miyao N, Masumori N, Takahashi A, Yanase M, Itoh N, et al. Risk factors for multiple intravesical recurrences of superficial bladder cancer. *Urology.* 2001;58(6):935-9.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mech Ageing Dev.* 2008;128:460-2.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659:93-108.

Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2009 [acesso 25 fev 2010]. Disponível em: <http://www.inca.org.br>.

Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Tipos de Câncer: bexiga. Rio de Janeiro: INCA; 2010 [acesso 25 fev 2010]. Disponível em: <http://www.inca.org.br>.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *Ca Cancer J Clin.* 2009;59:225-49.

Jiang HT, Hickey RJ, Abdel-Aziz W, Malkas LH. Effects of gemcitabine and araC on in vitro DNA synthesis mediated by the human breast cell DNA synthesome. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;45:320-8.

Joseph T, Kusumakumary P, Chacko P, Abraham A, Pillai MR. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 2005;217:17-24.

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 2001; 478:23–43.

Kaufman DS. Challenges in the treatment of bladder cancer. *Ann Oncol.* 2006;17(5):106-12.

Kausch I, Bohle A. Molecular aspects of bladder cancer III. Prognostic markers of bladder cancer. *Eur Urol.* 2002;41(1):15-29.

Kielb SJ, Nikhil LS, Rubin MA, Sanda MG. Functional p53 mutation as a molecular determinant of paclitaxel and gemcitabine susceptibility in human bladder cancer. *J Urol.* 2001;166(2):482-87.

Kim E, Giese A, Deppert W. Wild type p53 in cancer cells: when a guardian turns into a blackguard. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(1):11–20.

Kim IY, Kim SJ. Role of bone morphogenetic proteins in transitional cell carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2006;241(1):118-23.

Kim Y, McBride J, Zhang R, Zhou X, Wong DT. p12CDK2-AP1 mediates DNA damage responses induced by cisplatin. *Oncogene.* 2005;24:407–18.

Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Bush C, Cheng L, et al. Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology.* 2005;66(6):4-34.

Köberle B, Tomicic MT, Usanova S, Kaina B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* In press 2010.

Latini DM, Lerner SP, Wade SW, Lee DW, Quale DZ. Bladder cancer detection, treatment and outcomes: opportunities and challenges. *Urology.* 2010;75(2):334–39.

Latz D, Fleckenstein K, Eble M, Blatter J, Wannenmacher M, Weber KJ. Radiosensitizing potential of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'- deoxycytidine)

within the cell cycle *in vitro*. Int. J. Radiat Oncol Biol Phys. 1998;41(4):875-82.

Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. Am J Physiol Renal Physiol. 2000;278:867–74.

Maslov AY, Vijg Jan. Genome instability, cancer and aging. Biochim Biophys Acta. 2009;1790:963-9.

Moore MJ, Tannock IF, Ernst DS, Huan S, Murray N. Gemcitabine: a promising new agent in the treatment of advanced urothelial cancer. 1997;15:3441-5.

McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. Mutagenesis. 2008;23(3):183–90.

Merck O, Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. Environ Mol Mutagen. 1999;33(2):167-72.

Moufarij MA, Phillips DR, Cullinane C. Gemcitabine Potentiates Cisplatin Cytotoxicity and inhibits repair of cisplatin-DNA damage in ovarian cancer cell lines. Mol pharmacol. 2003;63(4):862-9.

Nagourney RA, Link JS, Blitzer JB, Forsthoﬀ C, Evans SS. Gemcitabine plus cisplatin repeating doublet therapy in previously treated, relapsed breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2000;18(11):2245-9.

Nilsson S, Ragnhammar P, Nygren P, Glimelius B. A Systematic Overview of Chemotherapy effects in urothelial bladder cancer. *Acta oncol*. 2001;40(2/3):371-90.

Nishiyama H, Watanabe J, Ogawa O. p53 and chemosensitivity in bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2008;13(4):282–6.

Oosterlinck W, van der Meijden A, Sylvester R, Böhle A, Rintala E, Solsona Narvón E, et al. Guidelines on TaT1(Non-Muscle Invasive) Bladder Câncer. European Association of Urology. 2006

Ostling O, Johanson KJ. Microeletroforetic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;123:291-8.

Pages V, Fuchs RPP. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*. 2002;21:8957-66.

Pang SK, Yu CW, Au-Yeung SCF, Ho YP. DNA damage induced by novel demethylcantharidin-integrated platinum anticancer complexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;363(1):235–40.

Paulwels B, Korst AE, Andriessen V, Baay M, Pattyn GG, Lambrechts HA, et al. Unraveling the mechanism of radiosensitization by gemcitabine: the role of TP53. *Radiat Res.* 2005;164(5):642-50.

Pfuhler S, Wolf HU. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. 1993;27:196-201.

Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, et al. Gemcitabine (2 ,2 -Difluoro-2 -Deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clin Cancer Res Clinical Cancer Research.* 2002;8:2499-2504.

Prives C., and Manfredi JJ (2005). The continuing saga of p53 – More sleepless nights ahead. *Mol Cell* 19, 719-721.

Qureshi KN, Naguib RN, Hamdy FC, Neal DE, Mellon JK. Neural network analysis of clinicopathological and molecular markers in bladder cancer. *J Urol.* 2000;163(2):630-3.

Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev.* 2007;33(1):9–23.

Rieger KM, Little AF, Swart JM, Kastrinakis WV, Fitzgerald JM, Hess DT, Libertino JA, Summerhayes IC. Human bladder carcinoma cell lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br J Cancer.* 1995;72: 683-90.

Rouissi K, Ouerhani S, Marrakchi R, Slama MRB, Sfaxi M, Ayed M, et al. Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genet and Cytogenet.* 2009;190(2):101-7.

Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbig N. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23(30):7518-28.

Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: Hanwalt PC, Friedberg EC, editors. *DNA repair mechanism.* New York: Academic Press. 1978:465-468.

Salani R, Kurman RJ, Giuntoli R, Gardner G, Bristow R, Wang TL, et al. Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *Int J Gynecol Cancer*. 2008;18(3):487–91.

Salvadori DMF, Ribeiro LR, Fenech M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. IN: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: RS; 2003.201-23.

Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E, Lu M, Prystowsky M, Childs G, et al. Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res*. 2002; 62:6973-80.

Sanchez-Suarez P, Ostrosky-Wegmanb P, Gallegos-Hernandez F, Penarroja-Flores R , Toledo-Garcia J , Bravo JL , et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutat Res*. 2008;640(1-2):8-15.

Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(1):44-55.

Shariat SF, Milowsky S, Droller MJ, M.D. Bladder cancer in the elderly. *Urol Oncol.* 2009;27:653–67.

Shelley MD, Mason MD, Kynaston H. Intravesical therapy for superficial bladder cancer: a systematic review of randomised trials and meta-analyses. *Cancer Treat Rev.* In press 2010.

Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-97.

Smith JA. Patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder and their smoking status. *Cancer.* 1999;86:2192-4.

Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene.* 2007;26(15):2145–56.

Soussi T. p53 antibodies in the sera of patients with various types of cancer. *Cancer Res.* 2000;60(7):1777–88.

Stadler WM, Kuzel T, Roth B, Raghavan D, Andrew Dorr F. Phase II study of single-agent gemcitabine in previously untreated patients with metastatic urothelial cancer. *J Clin Oncol.* 1997;(15):3394-3398.

Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, Kikura-Hanajiri R, Hasegawa R, Maekawa K et al. Pharmacokinetics of Gemcitabine in Japanese Cancer Patients: The impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol.* 2007;25:32-42.

Suyama T, Ueda T, Fukasawa S, Imamura Y, Nakamura K, Miyasaka K, et al. Combination of gemcitabine and paclitaxel as second-line chemotherapy for advanced urothelial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2009;39(4):244–250.

Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol.* 1991;283:157-64.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):979-87.

Vogelzang NJ, Stadler WM. Gemcitabine and other new chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic bladder cancer. *Urology.* 1999;53:243-50.

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

von der Maase H, Andersen L, Crino L, Weinknecht S, Dogliotti L. Weekly gemcitabine and cisplatin combination therapy in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium: a phase II clinical trial. *Ann Oncol.* 1999;10(12):1461-5

von der Maase H. Gemcitabine and cisplatin in locally advanced and/or metastatic bladder câncer. *Eur J Cancer.* 2000a;36(2):13-6.

von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol.* 2000b;18:3068-77.

von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(21):4602-08.

Wallerand H, Bakkar AA, Diez de Medina SG, Pairon JC, Yang YC, Vordos D, et al. Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens. *Carcinogenesis*. 2005;26(1):177-84.

Wang D & Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-20.

Wozniak K, Czechowska A, Blasiak J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chem Biol Interact*. 2004;147(3):309–18.

Zhang J, Liu L, Gong Y, Zheng X, Yang M, Cui J, Shen S. Synthesis, characterization and antitumor activity of new type binuclear platinum(II) complexes. *Eur J Med Chem*. 2009;44(5):2322-7.