

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM CÉLULAS UROTELIAIS
ESFOLIADAS DE PACIENTES COM HISTÓRIA DE
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS**

JOÃO PAULO DE CASTRO MARCONDES

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

BOTUCATU - SP

2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM CÉLULAS UROTELIAIS
ESFOLIADAS DE PACIENTES COM HISTÓRIA DE
CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS**

Mestrando: João Paulo De Castro Marcondes

Orientadora: Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor De Oliveira

Co-orientadora: Dra. Daisy Maria Favero Salvadori

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

BOTUCATU - SP

2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Elisa e Joaquim por estarem sempre presentes em minha vida e por me darem forças para enfrentar com coragem e dignidade todas as dificuldades.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira pela sua orientação, paciência, incentivo, compreensão nos momentos difíceis e principalmente pela confiança depositada.

À Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, por contribuir com meu amadurecimento científico e pessoal e principalmente por acreditar em meu potencial desde a iniciação científica, ajudando-me a transpor todas as limitações.

Aos pacientes envolvidos neste estudo, pelo carinho e pela confiança depositada

AGRADECIMENTOS

Ao *Lucas* pelo carinho, amizade, compreensão e paciência.

À *Luciana* que há tempos me acompanha nessa trajetória. Muito obrigado por sua amizade e por seu amor.

Aos amigos da faculdade: *Xot's, Vi, Tuba, Elseve, Gorran, Sabão* e principalmente ao meu irmão *Júlio* e ao *Sombra*, pela amizade e carinho.

Aos meus companheiros de mestrado *Kelly M. e Alexandre CH* agradeço pela grande amizade e espero que continuemos juntos por muito tempo.

Aos colegas e amigos do Departamento de Patologia: *Glenda, Elaine, Lízia, Mariana, Priscilla, Carlota, Shadia, Renata, Rodrigo, Dani, Renato, Daniel, Eliana, Clarissa, Pati, Marina, Tânia, Ana Paula, Meire, Mara, Paulo, Bruno, Tony, Mitscheli, Meri, João, Marize, Andréia, Liane, Grazi, Jossimara, Camila, Carol, Juju, Laura, Rita, Silvana, Isabel, Claudinei, Hélio, Carlão, Edna, Luciano, Denisinha, Lúcia, Cícera, Glória e PC.*

As meninas da citologia *Renatinha, Lili e Fabiane* pela amizade e contribuição para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas da endoscopia: *Edi, Claudelis, Juliana, Fátima, Fatiminha, Dona Irene, Tereza*, obrigado pelo companheirismo e pela grande contribuição.

A todos os professores do Departamento de Patologia, em especial ao *Dr. João Lauro Viana de Camargo, Dra. Maria Domingues, Dra. Denise Fecchio, Dra. Márcia Guimarães e Dra. Maria Aparecida M. Rodrigues*, por estarem sempre dispostos a auxiliar-me.

A *Dra. Sílvia Regina Rogatto* e ao laboratório NeoGene, em especial à *Eliane, Cássia, Sara e Greicy*, pela amizade e pelo suporte científico.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte financeiro.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida

Índice:

1 – Revisão da Literatura

1.1 - Fatores de risco associados ao desenvolvimento de CCT.....1

1.2 – Carcinoma de células transicionais.....4

1.3 – Citologia urinária.....7

1.4 – Teste do micronúcleo.....8

2 – Referências Bibliográficas.....10

3 – Objetivos.....15

4 – Manuscrito

Resumo.....18

Abstract.....19

Introdução.....20

Casuística e Métodos.....21

Resultados.....24

Discussão.....32

Conclusão.....35

Referências.....36

5 - Anexos

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....38

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....39

Entrevista aplicada aos sujeitos da pesquisa.....42

Justificativa de alteração no título do Projeto de Pesquisa.....43

Índice de Tabelas:

Tabela 1 - Caracterização da população com história de carcinoma de células transicionais (CCT) de bexiga.....**26**

Tabela 2 - Caracterização da população sem história de neoplasia urotelial (controle).....**27**

Tabela 3 - Frequências individuais de células uroteliais micronucleadas em indivíduos com e sem história prévia de carcinoma de células transicionais (CCT).....**28**

Tabela 4 - Frequência de células urotelias micronucleadas em pacientes com e sem história de carcinoma de células transicionais de bexiga (CCT), distribuídos de acordo com o hábito tabagista.....**29**

Tabela 5 - Frequência de células uroteliais micronucleadas em indivíduos com e sem história de carcinoma de células transicionais de bexiga (CCT), distribuídos de acordo com a exposição ocupacional a substâncias tóxicas e o hábito tabagista.....**30**

Tabela 6 - Relação entre variáveis demográficas, de exposição ao tabaco e de história de carcinoma de células transicionais de bexiga (CCT) com a incidência de CCT e a frequência de células uroteliais micronuclead

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de CCT

O acentuado crescimento urbano observado nas últimas décadas, e a conseqüente necessidade de produção em larga escala, seja de produtos industriais ou agrícolas, levam a utilização de novas tecnologias e o emprego de diversos agentes químicos com o intuito de incrementar a produtividade de tais setores. No entanto, tal desenvolvimento vem associado à exposição de indivíduos ou populações a agentes xenobióticos ambientais que estão relacionados a efeitos deletérios. Dentre as conseqüências dessa exposição, destaca-se a gênese de neoplasias quimicamente induzidas compreendendo cerca de 70% a 80% de todos os cânceres humanos (Vennit, 1996; David & Muir, 1996; Perera, 1996).

A associação entre a industrialização e o desenvolvimento neoplásico foi primeiramente demonstrada em 1895, por Rehn, pela observação do aumento da incidência de câncer de bexiga em trabalhadores alemães de indústrias de corantes a base de anilina. Mais tarde, foi observado que esta relação era devida à presença da amina aromática 2-naftilamina nesses corantes (Johansson & Cohen, 1997). A carcinogenicidade das aminas aromáticas (AAs) foi comprovada em estudos realizados entre o período de 1915 a 1950, demonstrando que trabalhadores das indústrias de corantes, indústria têxtil, de borracha e de produtos químicos, expostos a tais compostos apresentavam aumento da incidência de CCT (Case *et al.*, 1954). Mais recentemente, Hemstreet III *et al.* (2001) observando o aumento da incidência de CCT em trabalhadores de diversas indústrias da China, expostos as AAs, salientaram a importância da estratificação dos indivíduos expostos em grupos de alto, moderado e baixo risco para a melhor interpretação dos resultados.

Por outro lado, 23% dos casos de CCT em mulheres e 50% dos casos em homens, vêm sendo atribuídos ao tabagismo, especialmente às AAs 2-naftilamina e 4-aminobifenil contidas no cigarro, as quais são consideradas como agentes etiológicos associados ao aumento da proliferação e à hiperplasia do urotélio da bexiga. Outras substâncias como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e aldeídos insaturados que também são encontrados na fumaça do cigarro parecem estar envolvidas no desenvolvimento de diversos tipos de cânceres (Johansson & Cohen, 1997; Zeegers *et al.*, 2004). No entanto, há pouca evidência do envolvimento dos HAPs na etiologia do CCT, pois este composto é metabolizado diretamente no sítio de exposição sendo excretado pela urina na forma de metabólitos inativos (Kellen *et al.*, 2006). Zeegers *et al.* (2002) observaram que a associação entre o cigarro e o risco de desenvolvimento de CCT é atribuída ao tempo de tabagismo, mas não interfere nas diferenças na invasividade e morfologia do tumor. Além disso, o abandono do hábito de fumar e a idade da primeira exposição não estão associados a este risco quando se leva em conta o tempo total de tabagismo.

Lopez-Albente *et al.* (2006), avaliando a distribuição geográfica das mortes por câncer de pulmão e de bexiga na Espanha entre os anos de 1989 e 1998, observaram aumento dessas neoplasias em áreas de indústrias têxteis e de minério de sal, as quais estão associadas à poluição ambiental por metais pesados e arsênico. Além disso, os autores relataram o uso de praguicidas à base de arsênico, como o ácido cacodílico, o arsenato dissódico e o arsenato monossódico utilizados no cultivo do algodão e cereais na região da Andalusia como prováveis agentes carcinogênicos. Portanto, é necessário que se tenha atenção aumentada a populações expostas tanto ocupacionalmente quanto por meio da ingestão de alimentos ou

água contaminada por estes compostos, visto que há possível relação entre esta exposição e o desenvolvimento de CCT (Hopenhayn-Rich *et al.*, 1996)

Nohynek *et al.* (2004), em artigo de revisão, destacaram que, embora as substâncias contidas nas tinturas de cabelo possuam ação genotóxica *in vitro* (teste de Ames), a correlação destas com a carcinogenicidade *in vivo* é incerta. Além disso, a maioria dos estudos não observou associação entre a exposição, tanto dos consumidores quanto dos profissionais, com o aumento da incidência de câncer de bexiga e de outros tipos de câncer. Processos infecciosos urinários crônicos que geram níveis significativos de nitrosaminas endógenas na urina podem estar associados ao desenvolvimento de tumores de bexiga. Neste caso, pode-se citar como exemplo o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas devido a processo inflamatório causado pelo *Schistosoma Hematobium*, sendo as nitrosaminas consideradas relevantes na etiologia deste tipo de tumor (Johansson & Cohen, 1997). Outros compostos também foram relacionados ao desenvolvimento de CCT, dentre os quais se destacam a clornafazina, agente alquilante utilizado no tratamento de neoplasias hematológicas e que teve seu uso descontinuado após observação de que a 2-naftilamina seria seu principal metabólito; a fenacetina, composto presente em alguns analgésicos e com tempo de indução de CCT semelhante ao observado em indivíduos expostos a AAs; a ciclofosfamida, cujo metabólito acroleína é considerado cancerígeno intermediário (Cohen & Johansson, 1992).

Essas informações demonstram que os estudos epidemiológicos desempenham papel relevante na identificação de fatores de risco associados ao desenvolvimento de neoplasias ou de outras doenças crônico-degenerativas e salientam a necessidade de se avaliar o efeito combinado dos fatores de exposição ambientais e fatores genéticos.

1.2 Carcinoma de células transicionais

Aproximadamente 90% de todas as neoplasias de bexiga são de origem epitelial sendo designadas como carcinoma de células uroteliais ou carcinoma de células transicionais (CCT) (Gandour-Edwards *et al.*, 2002; Daniely *et al.*, 2005). No Brasil, o CCT ocupa a 7ª e a 10ª posição entre as neoplasias que acometem o sexo masculino e feminino, respectivamente (INCA, 1999). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, no Brasil, em 2000, a proporção de mortes por esta neoplasia foi de 1,73% (INCA, 2003).

Atualmente, o CCT pode ser classificado em dois subtipos genéticos: tumores geneticamente estáveis e tumores geneticamente instáveis, correspondentes a duas entidades morfolologicamente distintas. A primeira categoria inclui os tumores papilíferos não invasivos de baixo grau (pTa, grau 1 e grau 2). Já os geneticamente instáveis correspondem a tumores de alto grau (pTa grau 3 e CIS) e invasivos (estádio pT1-4) (Mazzucchelli *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006) (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação das neoplasias uroteliais de bexiga (adaptado, WHO, 2004)

Neoplasias não-invasivas	1. Neoplasia urotelial papilífera de baixo potencial maligno	Neoplasias geneticamente estáveis pTa G1 - II
	2. Carcinoma papilífero não-invasivo de baixo grau	
	3. Carcinoma papilífero não invasivo de alto grau	Neoplasias geneticamente instáveis pTa GIII CIS pT1 - 4
	4. Carcinoma <i>in situ</i>	
Neoplasias invasivas	pT1 ↓ pT2-pT4	

O CCT de bexiga tem como características principais a multifocalidade e o alto índice de recorrência (Denzinger *et al.*, 2006). De fato, 70% dos carcinomas superficiais,

especialmente as lesões pTa (tumores papilíferos não invasivos de baixo grau), são recorrentes sendo que 10% destas progridem para a invasividade, 20% a 30% das lesões pT1 progridem para a invasão muscular e caso essas estejam associadas a lesões de alto grau ou carcinoma *in situ* (CIS), a progressão pode ocorrer acima da metade dos casos (Laudadio *et al.*, 2005). Desta forma, as recidivas associadas aos procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor tornam o câncer de bexiga uma patologia de alta morbidade (Reznicoff *et al.*, 2000).

O entendimento da clonalidade dos tumores multifocais de bexiga é importante para o estabelecimento de estratégias terapêuticas, visto que, atualmente, há uma tendência crescente no desenvolvimento de novas terapias contra os alvos moleculares específicos desses tumores (Denzinger *et al.*, 2006). Nesse contexto, foram desenvolvidas duas hipóteses na tentativa de elucidar o processo de carcinogênese urotelial. A primeira atribui uma origem monoclonal às lesões, ou seja, os tumores multifocais ou recorrentes originar-se-iam de uma única célula transformada que prolifera e coloniza outras regiões da bexiga, por meio da migração intra-epitelial ou transportada pela urina. A segunda hipótese atribui uma origem policlonal, sugerindo que as substâncias cancerígenas presentes na urina afetariam a bexiga em múltiplos sítios, levando ao desenvolvimento de tumores multifocais de maneira independente (Hafner *et al.*, 2002).

A carcinogênese da bexiga, assim como a maioria dos tumores humanos, ocorre por meio de múltiplas etapas caracterizadas por alterações genéticas que sinalizam para a transformação maligna de uma célula inicialmente normal (Philips & Richardson, 2006). Essas alterações podem ocorrer em regiões de microsátélites, genes supressores tumorais, oncogenes/proto-oncogenes, e em genes reguladores do ciclo celular (Habuchi *et al.*, 2005).

podendo desencadear um quadro de instabilidade genética, caracterizada por aumento significativo na taxa de mutações, sendo, portanto, considerada um evento inicial no processo de carcinogênese. Segundo Catto *et al.* (2004), a instabilidade genética pode apresentar-se em dois níveis: o primeiro, compreende as alterações nucleotídicas de base única (inserções/deleções) que resultam em erros de leitura e são observadas frequentemente em regiões de microsátélites (instabilidade de microsátélites); o segundo, compreende as alterações cromossômicas (instabilidade cromossômica) caracterizadas por perdas ou ganhos de fragmentos ou cromossomos inteiros, e que resultam em perdas ou ampliações de regiões de DNA que podem conter genes cruciais para o desenvolvimento neoplásico.

De fato, vários autores observaram a existência de alterações cromossômicas numéricas em células uroteliais neoplásicas e não neoplásicas de pacientes com história de câncer de bexiga (Kruger *et al.*, 2003; Pycha *et al.*, 2004; Obermann *et al.*, 2004; Latif *et al.*, 2004, Degtyar *et al.*, 2004). As alterações mais frequentemente encontradas foram a polissomia dos cromossomos 3, 7 e 17 e a monossomia do cromossomo 9 (Kruger *et al.*, 2003; Obermann *et al.*, 2004; Latif *et al.*, 2004; Degtyar *et al.*, 2004, Pycha *et al.*, 2004). Esta última, juntamente com a alta frequência de polissomia do cromossomo 17 foi relacionada, de maneira independente, à recorrência do CCT (Pycha *et al.*, 2004; Kruger *et al.*, 2003; Degtyar *et al.*, 2004). Ishiwata *et al.* (2001), também observou que 100% dos pacientes com perdas do cromossomo 17 apresentaram recorrências, em detrimento de 23% sem esta alteração.

Várias alterações gênicas já foram relacionadas com o desenvolvimento de CCT em seres humanos: mutações nos genes *TP53* (Malmstrom *et al.*, 2002), mutações nos genes da família *RAS*, que ocorrem em 10% dos pacientes com tumores vesicais e dobram o risco de

recorrências (Przybojewska *et al.*, 2000; Johne *et al.*, 2003) e alterações em regiões de microssatélites no cromossomo 9, são representativas de instabilidade genômica (Turyn *et al.*, 2006). Além disso, Friedrich *et al.* (2005) observaram que a metilação dos genes *SOCS-1*, *STAT-1*, *BCL-2*, *DAPK*, *E-caderina* está associada ao desenvolvimento de tumores recorrentes, e que o silenciamento do gene *TIMP3*, está associado ao aumento da sobrevida livre de recorrência.

1.3 Citologia urinária

A cistoscopia e o exame citológico são considerados procedimentos padrão no acompanhamento dos pacientes com história de CCT e no monitoramento de indivíduos com sintomatologias suspeitas para esta neoplasia, incluindo hematúria, dissúria e polaciúria. No entanto, o exame endoscópico apresenta limitações na detecção de lesões microscópicas, e a análise citológica, por ser subjetiva e dependente da experiência do citopatologista, apresenta sensibilidade diminuída principalmente para as lesões de baixo grau (Fracasso *et al.*, 2004). Daniely *et al.* (2006) observaram que de 22 pacientes com biópsias positivas para CCT, apenas 61% tiveram o mesmo diagnóstico pela análise citológica, em detrimento a 100% de concordância pela análise citogenética utilizando sondas para os centrômeros dos cromossomos 3, 7 e 17 e para o *locus* 9p 21. Assim, o emprego de técnicas que aumentem a sensibilidade e especificidade para a detecção precoce da doença torna-se necessário, tanto em pacientes submetidos à ressecção do tumor de bexiga, quanto em pacientes considerados como grupo de risco ao desenvolvimento do CCT. Nesse contexto, o emprego de biomarcadores - parâmetros biológicos que refletem o comportamento de determinada entidade biológica frente às alterações ambientais ou decorrentes de alterações constitutivas

da mesma - para avaliação de danos citogenéticos, como a frequência de micronúcleos, pode ser utilizada para a avaliação de risco ao desenvolvimento de neoplasias em diferentes tecidos.

1.4 Teste do Micronúcleo

Os micronúcleos (MN) são corpúsculos compostos por cromatina e envoltos por uma membrana nuclear, localizados próximos ao núcleo principal. Morfologicamente apresentam textura cromatídica semelhante ao núcleo principal, no entanto distinguem-se deste, pelo seu tamanho reduzido. Originam-se de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal das células filhas durante a divisão celular. Portanto, são observados em células que sofreram algum tipo de dano no DNA, sendo resultantes de eventos mutagênicos verdadeiros, pois representam mutações cromossômicas adquiridas por uma determinada célula e que foram transmitidas para as células filhas, após um ciclo de divisão celular (Speit et al., 2007).

O teste do micronúcleo (MN) é um teste de mutagenicidade amplamente utilizado no biomonitoramento de populações humanas ou sistemas biológicos que estejam expostos a agentes químicos, físicos e biológicos (Bolognesi *et al.*, 2004; Thierens *et al.*, 1999). Pode ser utilizado em diferentes tipos celulares como linfócitos e células epiteliais, tanto em modelos animais quanto em humanos (Cavallo *et al.*, 2006; Balakrishnan *et al.*, 2006; Buajeeb *et al.*, 2007). Trata-se de um teste simples, rápido, eficiente e de baixo custo para a detecção de danos no DNA (Natarajan, 2002; Norppa, 2003). A frequência de micronúcleos em células epiteliais esfoliadas é importante não apenas para a detecção de agentes clastogênicos (que causam quebras cromossômicas) e aneugênicos (que causam perdas

cromossômicas) como, também, para a detecção de indivíduos com risco aumentado para o desenvolvimento de patologias relacionadas a mutações (Majer *et al.*, 2001). Além disso, a quantificação de danos cromossômicos nesses tecidos permite a avaliação dos efeitos de substâncias mutagênicas e/ou carcinogênicas no tecido alvo de ação das mesmas (Speit *et al.*, 2007). Deste modo, o teste do MN em células esfoliadas pode ser considerado uma ferramenta importante para a detecção de efeitos mutagênicos tecido-específicos, sendo importante para a identificação de substâncias com efeitos potencialmente deletérios, bem como em estudos de avaliação de risco.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balakrishnan S, Eastmond D.A. Micronuclei and cell proliferation as early biological markers of ortho-phenylphenol-induced changes in the bladder of male F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44: 1340–7.

Bolognesi C, Landine E, Perrone E, Roggieri P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat. Res.* 2004; 557:109 – 17.

Buajeeb W, Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T. Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. *Mutat. Res.* 2007; 627: 191–6.

Case RA, Hosker ME, McDonald DB, Pearson JT. Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and betanephthylamine. *Br. J. Ind. Med.* 1954; 11: 75–104.

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

Cavallo D, Ursini CL, Carelli G, Iavicoli I, Ciervo A, Perniconi B, *et al.* Occupational exposure in airport personnel: Characterization and evaluation of genotoxic and oxidative effects. *Toxicol.* 2006; 223: 26-35.

Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. (Review) *Urol Clin. North. Am.* 1992; 19: 421–8.

Daniely M , Rona R, Kaplan T, Olsfanger S, Elboim L, Zilberstien Y, *et al.* Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urol.* 2005; 66(6): 1354-59.

David DL, Muir C. Estimate avoidable causes of cancer. *Environ. Health Prospect.* 1996; 103: 301 – 6.

Degtyar P, Neulander E, Zirkin H, Yusim I, Douvdevani A, Mermershtain W, *et al.* Fluorescence in situ hybridization performed on exfoliated urothelial cells in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol.* 2004; 63(2): 398-401.

Denzinger S, Mohren K, Knuechel R, Wild PJ, Burger M, Wieland WF, *et al.* Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses. *Human Pathology.* 2006; 37: 143-57.

Fracasso ME, Franceschettia P, Doriaa D, Talamini G, Bonetti F. DNA breaks as measured by the alkaline comet assay in exfoliated cells as compared to voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer: a study of 105 subjects. *Mutat. Res.* 2004; 564: 57-64.

Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2769- 78.

Gandour-Edwards R, Lara PN, Folkins AK, LaSalle JM, Beckett L, Li Y *et al.*. Does HER2/neu expression provide prognostic information in patients with advanced urothelial carcinoma? *Cancer* 2002; 95: 1009-15.

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

Hafner C, Knuechel R, Stoehr R, Hartmann A. Clonality of multifocal urothelial carcinomas: 10 years of molecular genetic studies. *Int. J. Cancer* 2002; 101: 1 -6.

Hemstreet III GP, Yin S, Ma Z, Bonner RB, Bi W, Rao JY, *et al.* Biomarker risk assessment and bladder cancer detection in a cohort exposed to benzidine. *J. Nat. Cancer Inst.* 2001, 93: 427-36.

Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Fuchs A, Bergoglio R, Tello EE, Nicolli H, *et al.* Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. (comment in: *BMC Public Health* 2006; Serial on the Internet, 2006 Jan; cited 2006 oct 11. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/.) *Epidemiology* 1996; 7:117-124.

INCA – Instituto Nacional do Câncer (homepage da internet). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 1999 (acesso 10 out 2006) Disponível em <http://www.inca.gov.br>.

INCA – Instituto Nacional do Câncer (homepage da internet). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2003 (acesso 10 out 2006) Disponível em <http://www.inca.gov.br>.

Ishiwata S, Takahashi S, Homma Y, Tanaka Y, Kameyama S, Hosaka Y, *et al.* Noninvasive detection and prediction of bladder cancer by fluorescence in situ hybridization analysis of exfoliated urothelial cells in voided urine. *Urol.* 2001; 57: 811-15.

Johansson SL and Cohen SM. Epidemiology and Etiology of Bladder Cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 1997; 13: 291-8.

Johne A, Roots I, Brockmoller J. A single nucleotide polymorphism in the human H-ras proto-oncogene determines the risk of urinary bladder cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003; 12: 68 – 70.

Jones JS. Dna-based molecular cytology for bladder cancer surveillance. *Urol.* 2006; 67(3A): 35-47.

Kellen E, Zeegers M, Paulussen A, Vlietinck R, Van Vlem E, Veulemans H, *et al.* Does occupational exposure to PAHs, diesel and aromatic amines interact with smoking and metabolic genetic polymorphisms to increase the risk on bladder cancer? The Belgian case control study on bladder cancer risk. *Cancer Lett.* (Serial on the Internet). 2006 Jan (cited 2006 oct 11). Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/.

Kruger S, Mess F, Bohle A, Feller AC. Numerical aberrations of chromosome 17 and the 9p21 locus are independent predictors of tumor recurrence in non-invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int. J. Oncol.* 2003; 23(1): 41-8.

Latif Z, Watters AD, Dunn I, Grigor K, Underwood MA, Bartlett JM. HER2/neu gene amplification and protein overexpression in G3 pT2 transitional cell carcinoma of the bladder: a role for anti-HER2 therapy? *Eur. J. Cancer.* 2004; 40(1): 56-63.

Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, Savage SJ, Hoda RS, Lage JM, *et al.* Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU Int.* 2005; 96: 1280-85.

Lopez-Abente G, Aragonés N, Ramis R, Hernandez-Barrera V, Perez-Gomez B, Escolar-Pujolar A, *et al.* Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: Possible role of mining and industry. *BMC Public Health* (Serial on the Internet). 2006 Jan (cited 2006 oct 11). Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/.

Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cell as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.* 2001; 489: 147-72.

Malmstrom PU, Ren ZP, Sherif A, Torre M, Wester K, Thorn M. Early metastatic progression of bladder carcinoma: molecular profile of primary tumor and sentinel lymph node. *J. Urol.* 2002; 168: 2240 – 44.

Mazzuchelli R, Barbisan F, Stramazotti, Montironi R, Lopez-Beltran A and Scarpelli. Chromosomal abnormalities in macroscopically normal urothelium in patients with bladder pT1 e pT2 urothelial carcinoma. *A fluorescence in situ hybridization study and correlation with histologic features.* *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 2005; 27: 143-51.

Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res.* 2002; 504: 3 – 16.

Nohynek GJ, Fautz R, Benech-Kieffer F, Toutaina H. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42: 517–43.

Norppa H and Falk GCM. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003; 18: 221 – 33.

Obermann EC, Meyer S, Hellge D, Zaak D, Filbeck T, Stoehr R, *et al.* Fluorescence in situ hybridization detects frequent chromosome 9 deletions and aneuploidy in histologically normal urothelium of bladder cancer patients. *Oncol. Rep.* 2004; 11(4): 745-51.

Perera FP. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assesment and prevention. *J. Nat. Cancer Inst.* 1996; 88: 496 – 590.

Philips JL and Richardson IC. Aneuploidy in bladder cancers: the utility of fluorescent in situ hybridization in clinical practice. *BJU Int.* (Serial on the Internet). 2006 Aug (cited 2006 sept 12). Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/.

Pycha A, Lodde M, Comploj E, Negri G, Egarter-Vigl E, Vittadello F, *et al.* Intermediate-risk urothelial carcinoma: an unresolved problem? *Urol.* 2004;63(3): 472-5.

Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P. H-RAS, K-RAS and N-RAS gene activation in human bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2000; 121: 73 – 7.

Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, *et al.* Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol. Oncol.* 2000; 5: 191-203.

Speit G, Schmid O, Fröhler-Keller M, Langb I, Triebig G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. *Mutat. Res.* 2007; 627: 129-35.

Thierens H, Vral A, Barbé M, Aousalah B, De Ridder L. A cytogenetic study of a nuclear power plant workers using the micronucleus centromere assay. *Mutat. Res.* 1999; 445: 105 – 11.

Turyn J, Matuszewski M and Schlichtholz B. Genomic instability analysis of urine sediment versus tumor tissue in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol. Rep.* 2006; 15: 259-65.

Vennit S. Mechanisms of spontaneous humam cancers. *Environ. Health Prospect.* 1996; 103: 633 – 7.

WHO (2004). IN: Tumors of the urinary system and male genital organs. Edited by Eble JN, Sauter G, Epstein JI & Sesterhenn IA. World Health Organization Classification of Tumors. IARC Press, Lyon.

Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 2002; 13: 83–90

Zeegers MPA, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt FBPA. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World. J. Urol.* 2004; 21: 392–401.

3 OBJETIVOS

Com base no exposto, o presente estudo foi desenvolvido no intuito de detectar danos citogenéticos em células uroteliais esfoliadas de pacientes com história de CCT e se existe um perfil de danos cromossômicos que possa caracterizar a população estudada, dando assim, base para a validação do teste do MN como biomarcador de risco para o desenvolvimento neoplásico. Os objetivos específicos apresentam-se descritos abaixo:

- investigar a existência de possíveis danos cromossômicos, por meio do teste do micronúcleo no epitélio macroscopicamente normal de pacientes com história prévia de CCT com e sem história de tabagismo, mas com diagnóstico atual “negativo para neoplasia”;
- relacionar os eventuais danos cromossômicos com as alterações citológicas e histológicas do carcinoma de bexiga;
- avaliar a sensibilidade do teste do micronúcleo como biomarcador para avaliação de risco ao desenvolvimento neoplásico em pacientes com história de CCT.

4 - MANUSCRITO

Danos citogenéticos em células uroteliais esfoliadas de pacientes com história de carcinoma de células transicionais #

João Paulo de Castro Marcondes*, Daisy Maria Favero Salvadori , Álisson Marques de Miranda Cabral Gontijo, João Lauro Viana de Camargo, Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira

Núcleo de Avaliação de Impacto Ambiental sobre a saúde Humana – TOXICAM, Depto. Patologia – Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu, Brasil

*Correspondência: Faculdade de Medicina – UNESP, Departamento de Patologia, 18618-000, Botucatu – SP, Brasil. Tel. 55-14-3882-8255; fax: 55-14-3815-2348; e-mail: marcondes_bio@yahoo.com.br

Palavras-chave: carcinoma de células transicionais; células uroteliais micronucleadas; recorrência; tabagismo

#Trabalho apresentado de acordo com as normas da Revista *Environmental and Molecular Mutagenesis* ISSN:0893-6692

RESUMO

O carcinoma de células transicionais (CCT) da bexiga possui como principal característica o alto índice de recorrência (70% dos carcinomas superficiais). Desta forma, é necessário acompanhar rigorosa e periodicamente os pacientes acometidos por tal neoplasia, bem como empregar técnicas sensíveis para a detecção precoce da doença, tanto em pacientes submetidos à ressecção do tumor de bexiga, quanto em pacientes considerados como grupo de risco para o desenvolvimento do CCT. O presente estudo tem por objetivo utilizar o teste do micronúcleo como ferramenta para a avaliação de danos cromossômicos em células uroteliais obtidas por lavado vesical de pacientes com história de CCT. A frequência de células uroteliais micronucleadas foi avaliada em 77 pacientes (não tabagistas, tabagistas atuais e ex-tabagistas) sem ou com história de CCT, mas com diagnóstico atual “negativo para neoplasia“. Foi detectado aumento significativo ($P=0,003$) de células micronucleadas somente nos pacientes não fumantes e com história de CCT, quando comparados aos indivíduos do grupo controle (não fumantes e sem história de CCT). Não foram detectados efeitos do tabagismo na frequência de células micronucleadas, e nem associação desse hábito com o grau do tumor. Concluindo, indivíduos não tabagistas com história de neoplasia urotelial apresentaram frequência aumentada de micronúcleos em células esfoliadas da bexiga, mesmo após a ressecção do tumor. Portanto, o epitélio citologicamente normal da bexiga de indivíduos com história de CCT, pode apresentar células geneticamente instáveis, que poderiam conferir um risco aumentado para desenvolvimento neoplásico.

ABSTRACT

The main feature of transitional cell carcinoma (TCC) is the high recurrences rates of superficial carcinomas. Therefore, patients must be monitored regularly by periodic cystoscopies. The employment of sensible techniques are important for detecting bladder cancer and early disease in patients undergoing tumor resection and individuals with high risk for tumor development.

To evaluate whether cytogenetic disorders can be evolved in the tumor development and recurrences, the frequency of micronucleated cells (MNC) was established in non-neoplastic exfoliated bladder cells from patients with history of TCC. Seventy-seven patients with and without history of bladder cancer, either smokers or non-smokers, with current diagnosis “negative for neoplasia” were included. The results showed a significant increase ($P < 0.01$) of MNC in patients with history of TCC and non-smokers when compared to counterpart group (without history of TCC and non-smokers). However, the same association was not observed in patients with TCC and smokers and in patients without history of TTC and smokers. Furthermore, was not observed correlation between smoking habits and tumor grade.

These results suggesting that non smokers with history of urothelial tumor had an increase of MNC even after tumor resection. Thus, the macroscopically “normal looking” urothelium of patients of history of TCC, still could be harbored genetically instable cells that can be related to high risk for neoplastic development *de novo*.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de bexiga é a neoplasia de trato geniturinário com maior incidência em países desenvolvidos [Frau *et al.*, 2006]. Aproximadamente 90% desses tumores são de origem epitelial sendo designados como carcinoma de células uroteliais ou carcinoma de células transicionais (CCT), e possuem como principais características a multifocalidade e o alto índice de recorrência [Daniely *et al.*, 2005; Denzinger *et al.*, 2006]. De fato, 70% dos carcinomas superficiais, especialmente as lesões pTa (tumores papilíferos não invasivos de baixo grau), são recorrentes sendo que 10% destas progridem para a invasividade; 20% a 30% das lesões pT1 progridem para a invasão muscular e, se associadas a lesões de alto grau ou carcinoma *in situ* (CIS), a progressão pode ocorrer acima de 50% dos casos [Laudadio *et al.*, 2005]. Desta forma, as recidivas, associadas aos procedimentos cirúrgicos periódicos para a ressecção do tumor, tornam o câncer de bexiga uma patologia de alta morbidade [Reznicoff *et al.*, 2000].

O tabagismo é considerado um dos principais fatores associados ao desenvolvimento de CCT, triplicando seu risco de incidência [Zeegers *et al.*, 2004]. Alguns estudos com células epiteliais humanas, detectaram aumento na frequência de micronúcleos na frequência de micronúcleos em células urotelias [Lehutter-Michel, 1995; Burgaz *et al.*, 1995] e em células esfoliadas da mucosa oral [Wu *et al.*, 2004], correlacionando assim, o tabagismo ao processo carcinogênico. No entanto, outros estudos não observaram efeito do mesmo, tanto em células da mucosa oral quanto em linfócitos de indivíduos ocupacionalmente expostos a substâncias tóxicas, como praguicidas e drogas anti-neoplásicas [Burgaz *et al.*, 1999; Pastor *et al.*, 2001, 2003; Bolognesi *et al.*, 2002] A avaliação da frequência de micronúcleos em células esfoliadas é uma ferramenta importante não apenas para a detecção de agentes

potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos com ação tecido-específica, mas, também, para avaliação de danos citogenéticos em lesões potencialmente cancerígenas [Speit & Schmid, 2006; Buajeeb *et al*, 2007; Hamurcu *et al.*, 2005]. Portanto, a utilização do teste do micronúcleo, associado à cistoscopia, ao exame citológico e ao exame endoscópico pode aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico permitindo a prevenção e melhor acompanhamento dos pacientes com história ou risco para o desenvolvimento de CCT.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar danos citogenéticos utilizando a frequência de MN em células uroteliais de pacientes com e sem história de CCT, fumantes e não fumantes na tentativa de utilizar este parâmetro na avaliação de risco para o desenvolvimento de neoplasia urotelial.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Pacientes

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu - SP aprovou a realização deste estudo (OF.276/2005-CEP). Todos os pacientes avaliados concordaram em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram analisadas lâminas de lavados vesicais processadas para o exame citopatológico de 77 pacientes submetidos à cistoscopia de rotina e que apresentavam diagnóstico atual “negativo para neoplasia”. Os pacientes foram distribuídos em dois grupos: 39 indivíduos (19 não tabagistas, 11 ex-tabagistas e 9 tabagistas atuais) com história prévia de CCT; 38 indivíduos (21 não tabagistas, cinco ex-tabagistas e 12 tabagistas atuais) sem história prévia de CCT (controle). A história de CCT foi obtida a partir dos resultados de biópsias, citologias

positivas e pela análise dos prontuários médicos. Os tumores foram classificados de acordo com a gradação histológica, em alto e baixo grau. No momento da última cistoscopia, apenas os indivíduos com biópsias negativas e diagnóstico citológico atual “negativo para neoplasia” foram incluídos no grupo com história de CCT. Informações sobre os hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool), exposição prévia a solventes orgânicos, quimioterápicos, radiação e praguicidas, foram obtidas por questionários aplicados antes ou imediatamente após a realização da cistoscopia de rotina. Os pacientes foram considerados tabagistas quando consumiram cinco cigarros ou mais por dia, durante pelo menos cinco anos; ex-tabagistas, quando pararam de fumar há mais de um ano. As Tabelas 1 e 2 mostram as características das populações estudadas.

Lavado vesical

Em média, de cada paciente, foram obtidos por meio da instilação intravesical de solução salina a 0,9% (“barbotagem”) 15 mL de lavado vesical. Esse volume foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e, após desprezado o sobrenadante, o sedimento foi citocentrifugado (citocentrífuga Cytospin II Shandon Elliott) à 1400 rpm por 10 minutos para confecção de duas lâminas: uma fixada com álcool 95% e outra seca ao ar, respectivamente coradas pelo métodos de Shorr e Giemsa para avaliação citopatológica de rotina,

Teste do micronúcleo

As lâminas preparadas para o exame citopatológico de rotina (coradas pelo método de Giemsa ou Shorr), com diagnóstico atual “negativo para neoplasia” foram avaliadas para a determinação da frequência de células micronucleadas. O número de células analisadas por lâmina variou entre 500 e 1000. Os critérios para a caracterização do micronúcleo foram aqueles descritos por Lehutcher-Michel *et. al.* [1995], sendo todas as lâminas analisadas em microscópio óptico de luz, com aumento de 1000X (imersão).

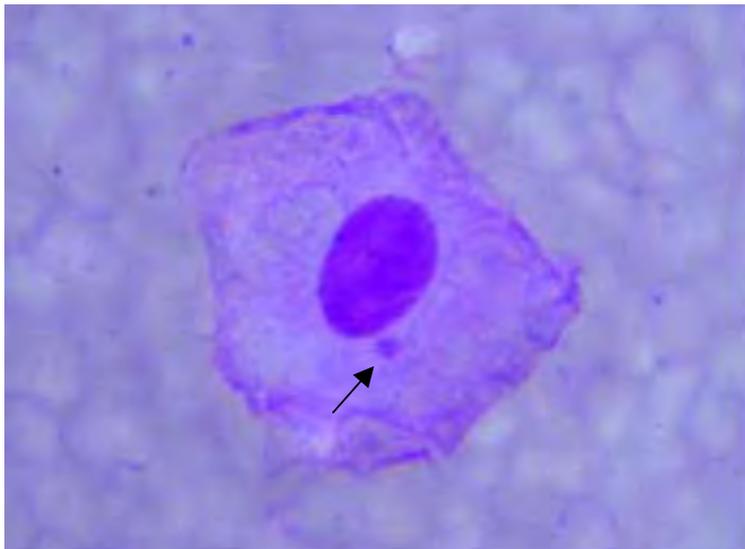


Fig 1 – Coloração de Giemsa – micronúcleo (seta) em célula urotelial (1.000 X)

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição do número de células uroteliais micronucleadas foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks. Foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis e o teste da Mediana, para verificar diferenças entre os grupos. Em alguns casos, para a análise estatística, os indivíduos tabagistas e ex-tabagistas foram agrupados em uma única categoria (com história de tabagismo). Os resultados foram considerados significativos com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Dos 39 pacientes com história de neoplasia de bexiga, 32 eram do sexo masculino e 11 do sexo feminino ($p < 0,001$), 29 apresentaram tumores recorrentes (74,3%) e 10 (25,7%) não recorrentes ($p < 0,001$). Dos 29 indivíduos com tumores recorrentes, 16 (55%) eram não tabagistas e 13 (45%) apresentavam história de tabagismo (ex-tabagistas e tabagistas atuais). Dos 10 pacientes (25,7%) com história de tumores não recorrentes, três (30%) eram não tabagistas e sete (70%) apresentavam história de tabagismo. De todos os indivíduos com história de CCT, 54% tiveram tumores de baixo grau e 46% de alto grau ($p > 0,05$). Dos 21 indivíduos com tumores de baixo grau, 11 (52%) eram não tabagistas e 10 (48%) apresentavam história de tabagismo. Por outro lado, dos 18 pacientes com tumores de alto grau, oito (44%) eram não tabagistas e 10 (56%) apresentavam história de tabagismo. Vinte e dois (56,4%) dos 39 indivíduos com história de CCT apresentavam história de exposição a compostos tóxicos, principalmente a derivados do petróleo, solventes orgânicos e praguicidas, contra apenas 10 (26,3%) dos 38 indivíduos sem história de CCT. A média de idade dos indivíduos com história de CCT e não tabagistas foi de 70 ± 15 anos enquanto a

dos indivíduos com história de tabagismo foi de 68 ± 10 anos. Os indivíduos do grupo controle (sem história de CCT) e não tabagistas apresentaram em média de idade de 59 ± 13 anos, e os indivíduos com história de tabagismo apresentaram em média 57 ± 12 anos. A Tabela 3 apresenta as frequências individuais de células uroteliais micronucleadas da população estudada.

A Tabela 4 apresenta a distribuição da frequência de células micronucleadas (número de células micronucleadas por 1000 células) em 77 pacientes submetidos à cistoscopia e distribuídos de acordo com os grupos descritos anteriormente. Foi observado aumento significativo ($p=0,003$) na frequência de células uroteliais micronucleadas no grupo de indivíduos com história de CCT e não tabagistas quando comparados aos indivíduos do grupo controle (sem história de CCT) e também não tabagistas. Não se observou efeito do tabagismo sobre a frequência de MN quando os indivíduos com história de CCT ou aqueles do grupo controle foram comparados entre si.

A frequência de células uroteliais micronucleadas em indivíduos com e sem história de CCT, expostos e não expostos ocupacionalmente a substâncias tóxicas é apresentada na Tabela 5. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os indivíduos expostos e não expostos tanto para o grupo com história de CCT, como para o controle.

Na Tabela 6 é mostrada a frequência de células com MN em grupos de indivíduos distribuídos de acordo com as variáveis idade e intensidade e tempo de exposição ao tabaco, e características tumorais (grau do tumor e recorrência). Nenhuma dessas variáveis influenciou significativamente a frequência de MN nas populações estudadas ($p > 0,05$).

Tabela 1- Caracterização da população com história de carcinoma de células transicionais (CCT) de bexiga.

Código do Paciente	Sexo	Idade (anos)	Nº cigarros/dia	Tempo de tabagismo (anos)	Grau máximo do tumor	Exposição a substâncias tóxicas	Tempo de exposição (anos)
SSM*	M	49	20	20	Baixo Grau	Solvente/tinta	19
WLC*	M	71	60	39	Alto Grau	Derivados do petróleo	9
ACB*	M	79	20	50	Alto Grau	Piretróide	5
BSRN*	M	68	20	50	Baixo Grau	Derivados do petróleo	21
SV*	M	74	20	8	Alto Grau	Derivados do petróleo	35
AB*	M	73	40	34	Alto Grau	Derivados do petróleo	49
JBS*	M	62	29	40	Alto Grau	Derivados do petróleo	30
ABL*	M	77	60	30	Alto Grau	-	-
NA*	M	82	20	10	Alto Grau	-	-
ACFM*	M	73	60	30	Baixo Grau	-	-
JS*	M	77	20	60	Baixo Grau	-	-
JJC	F	72	20	40	Baixo Grau	Solvente/tinta	12
AAP	M	72	8	64	Alto Grau	Organoclorados	10
JR	M	47	20	30	Alto Grau	Solvenetes/tinta	37
JMSo	M	73	12	55	Baixo Grau	Organoclorados	50
IOP	M	57	30	41	Baixo Grau	Solvente/tinta	5
SR	M	80	10	71	Alto Grau	-	-
LV	M	72	5	20	Baixo Grau	-	-
JF	M	59	20	31	Baixo Grau	-	-
JCD	M	51	20	36	Baixo Grau	-	-
EZ	M	65	-	-	Baixo Grau	Organoclorados	12
OA	M	85	-	-	Alto Grau	Sulforamidas	0.5
NPV	F	78	-	-	Baixo Grau	Piretróide	15
FA	M	81	-	-	Baixo Grau	Sulforamidas	3
CMS	M	79	-	-	Baixo Grau	Piretróide	2
JMS	M	36	-	-	Baixo Grau	Solvente/ tinta	6
IMAC	F	82	-	-	Baixo Grau	Praguicida não identificado	20
LB	M	89	-	-	Alto Grau	Derivados do petróleo	20
AAI	M	38	-	-	Baixo Grau	Organofosforado	4
OB	M	56	-	-	Baixo Grau	Organofosforado	20
ARB	F	72	-	-	Alto Grau	-	-
JPR	F	73	-	-	Alto Grau	-	-
RP	M	77	-	-	Baixo Grau	-	-
LBA	F	61	-	-	Baixo Grau	-	-
JB	M	80	-	-	Alto Grau	-	-
WMB	F	55	-	-	Alto Grau	-	-
LPF	M	80	-	-	Alto Grau	-	-
GLS	M	70	-	-	Alto Grau	-	-
BC	M	77	-	-	Baixo Grau	-	-
32M; 7F		69,3 ± 12,7*	25,7 ± 16,6	38 ± 16,9			17,5 ± 14,6

*Média ± DP; -: não relatado; * pacientes ex-tabagistas (tempo de ex-tabagismo: 18,2 ± 10 anos)

Tabela 2 - Caracterização da população sem história de neoplasia urotelial (controle)

Código do Paciente	Sexo	Idade (anos)	Nº cigarros/dia	Tempo de tabagismo (anos)	Exposição a substâncias tóxicas	Tempo de exposição (anos)
AAA*	M	61	10	30	Organofosforado	18
JEO*	M	56	20	40	Solvente/tinta	20
RAA*	M	36	10	5	Solvente/tinta	1
BAR*	M	78	5	12	-	-
OR*	M	57	20	47	-	-
CAMC	F	55	20	20	Piretróide	4
LCP	M	46	20	31	organofosforado	3
GG	F	53	12	30	-	-
AP	M	44	25	30	-	-
MFMB	F	38	20	6	-	-
LCM	M	52	40	35	-	-
GYC	M	62	6	40	-	-
ASF	M	72	20	45	-	-
APR	M	63	5	35	-	-
JPR	M	51	40	30	-	-
MHPM	F	60	20	40	-	-
CSC	F	82	20	40	-	-
JVF	M	39	-	-	Derivados do petróleo	14
RDO	M	58	-	-	Derivados do petróleo	6
RMF	M	76	-	-	Piretróide	50
AV	M	35	-	-	Derivados do petróleo	20
NSF	F	77	-	-	Piretróide	50
MSJ	F	74	-	-	-	-
SGB	F	37	-	-	-	-
AG	M	72	-	-	-	-
APM	M	51	-	-	-	-
AMJ	F	47	-	-	-	-
AAS	M	56	-	-	-	-
AF	F	58	-	-	-	-
AL	M	62	-	-	-	-
ATF	M	80	-	-	-	-
BRO	M	58	-	-	-	-
DS	F	58	-	-	-	-
JRL	M	65	-	-	-	-
JDM	M	62	-	-	-	-
LA	M	77	-	-	-	-
MDS	F	47	-	-	-	-
MF	F	58	-	-	-	-
		25M; 13F	58,2 ± 13*	18,4 ± 10,3	30,4 ± 12,7	18,6 ± 18

*Média ± DP; -: não relatado; *: pacientes ex-tabagistas (tempo de ex-tabagismo: 17 ± 21 anos)

Tabela 3 - Frequências individuais de células uroteliais micronucleadas em indivíduos com e sem história prévia de carcinoma de células transicionais (CCT)

Indivíduos com história prévia de CCT		Indivíduos sem história prévia de CCT	
Código do Paciente	% de células micronucleadas	Código do Paciente	% de células micronucleadas
SSM*	1,7	AAA*	3,0
WLC*	6,1	JEO*	2,0
ACB*	2,0	RAA*	0
BSRN*	0	BAR*	1,9
SV*	0	OR*	1,0
AB*	0	CAMC	9,2
JBS*	1,0	LCP	0
ABL*	3,2	GG	4,2
NA*	4,4	AP	1,6
ACFM*	0	MFMB	7,1
JS*	2,8	LCM	2,0
JJC	0	GYC	4,0
AAP	7,3	ASF	8,0
JR	6,4	APR	0
JMS _o	3,8	JPR	6,0
IOP	0	MHPM	0
SR	2,0	CSC	1,0
LV	0	JVF	0
JF	0	RDO	2,2
JCD	5,0	RMF	5,2
EZ	9,3	AV	1,0
OA	1,0	NSF	5,0
NPV	10,0	MSJ	1,8
FA	3,0	SGB	3,0
CMS	4,8	AG	1,8
JMS	5,4	APM	1,9
IMAC	0	AMJ	0,0
LB	9,0	AAS	0
AAI	4,5	AF	1,0
OB	3,0	AL	2,0
ARB	4,0	ATF	0
JPR	2,0	BRO	0
RP	1,0	DS	1,0
LBA	1,9	JRL	0
JB	3,5	JDM	0
WMB	3,3	LA	1,0
LPF	3,9	MDS	2,0
GLS	1,0	MF	1,0
BC	1,0		
	3,0 ± 2,8[#]		2,2 ± 2,4

* pacientes ex-tabagistas; [#] média ± desvio-padrão

Tabela 4 – Frequência de células urotelias micronucleadas em pacientes com e sem história de carcinoma de células transicionais de bexiga (CCT), distribuídos de acordo com o hábito tabagista.

Grupos	N° de Indivíduos	N° de células analisadas	N° de células micronucleadas	% de células micronucleadas
CCT	39	34040	102	3,0
não tabagistas	19	17052	65	3,8*
ex-tabagistas	11	9940	16	1,6
tabagistas atuais	9	7548	21	2,8
história de tabagismo ¹	20	16988	37	2,2
Controles	38	43249	96	2,2
não tabagistas	21	23033	36	1,7
ex-tabagistas	5	5194	10	1,9
tabagistas atuais	12	15022	50	3,3
história de tabagismo ¹	17	20216	60	3,0

¹ ex-tabagistas + tabagistas atuais; *p=0,003 em relação aos controles não tabagistas

Tabela 5 - Frequência de células uroteliais micronucleadas em indivíduos com e sem história de carcinoma de células transicionais de bexiga (CCT), distribuídos de acordo com a exposição ocupacional a substâncias tóxicas e o hábito tabagista.

Grupos	Expostos			Não expostos	
	Nº de indivíduos	% de células micronucleadas	Tempo de exposição (anos)	Nº de indivíduos	% de células micronucleadas
CCT	22	3,5	17,5 ± 14,6	17	2,3
não tabagistas	10	4,9	10,3 ± 8,1	9	2,4
ex-tabagistas	7	1,4	24,0 ± 15,3	4	2,2
tabagistas atuais	5	3,3	22,8 ± 19,6	4	2,1
história de tabagismo ¹	12	2,2	23,5 ± 16,4	8	2,2
Controles	10	2,9	18,6 ± 18,0	28	2,0
não tabagistas	5	3,0	28,0 ± 20,1	16	1,1
ex-tabagistas	3	2,2	13,0 ± 10,4	2	1,3
tabagistas atuais	2	4,0	3,5 ± 0,7	10	3,2
história de tabagismo ¹	5	2,8	9,2 ± 9,0	12	3,1

¹ ex-tabagistas + tabagistas atuais.

Tabela 6 - Relação entre variáveis demográficas, de exposição ao tabaco e de história de carcinoma de células transicionais de bexiga (CCT) com a incidência de CCT e a frequência de células uroteliais micronucleadas.

Fatores	Grupos	N° de indivíduos		% MN	
		CCT	Controles	CCT	Controles
Idade (anos)	< 60	10	23	3,2	2,0
	> 60	29	15	2,9	2,5
N° de cigarros/dia	≤ 20	14	14	2,6	3,1
	≥ 30	6	3	1,4	2,6
Tempo de tabagismo (anos)	t ≤ 30	7	8	2,2	4,0
	30 < t < 50	6	9	1,7	2,2
	t ≥ 50	7	-	2,7	-
Grau do tumor	Baixo grau	21	-	2,8	-
	Alto grau	18	-	3,2	-
Recorrência	tumores recorrentes	29	-	3,2	-
	tumores não recorrentes	10	-	2,4	-

DISCUSSÃO

No presente estudo não foi observado efeito das características tumorais (grau do tumor e recorrência) na frequência de células micronucleadas. Além disso, a idade também não afetou a frequência de MN tanto para os indivíduos com história de CCT, como para os indivíduos controle (sem história de CCT). Os dados da literatura corroboram nossos achados, já que a idade não foi um fator de interferência na frequência de células urotelias micronucleadas [Lehucher-Michel *et al.*, 1995; Burgaz *et al.*, 1995].

A frequência de células micronucleadas observada em pacientes não tabagistas com história de CCT, mostra que células portadoras de alterações genéticas, responsáveis ou não pelo desenvolvimento da neoplasia, estavam ainda presentes no epitélio da bexiga, mesmo após a ressecção do tumor, quando o epitélio foi considerado endoscópica e citologicamente normal. Portanto, tais pacientes teriam risco aumentado para o desenvolvimento neoplásico *de novo*, mesmo quando os resultados dos exames citopatológicos são “negativos para neoplasia”. Contrariamente, o aumento de MN não foi observado nos indivíduos do grupo CCT, tabagistas e/ou ex-tabagistas. Cabe ressaltar, que também não foi detectado efeito do tabagismo na frequência de células micronucleadas nos indivíduos sem história de CCT. Embora, nossos dados não tenham evidenciado efeito do tabaco nas populações estudadas, a associação entre o tabagismo e o aumento da frequência de células urotelias micronucleadas foi descrito por Burgaz *et al.* [1995] e Lehucher-Michel *et al.* [1995] em indivíduos sem história de CCT. Gontijo *et al.* [2001] detectaram aumento no nível de danos no DNA relacionado ao tabagismo, quando avaliaram células esfoliadas da bexiga pelo teste do cometa. Bonassi *et al.* [2003], utilizando-se de dados referentes à frequência de MN em linfócitos obtidos de 24 laboratórios de todo o mundo, mostraram que o efeito do tabagismo

não foi evidente, sendo observado um aumento significativo apenas no grupo de indivíduos considerados fumantes “pesados” (≥ 30 cigarros por dia).

Estudos realizados em linfócitos e células epiteliais da mucosa bucal de indivíduos expostos ocupacionalmente a praguicidas não evidenciaram efeito do tabagismo e da exposição a estes compostos na frequência de MN [Pastor *et al.*, 2001, 2003]. Porém, Burgaz *et al* [1999] observaram um aumento na frequência de MN apenas em linfócitos de enfermeiras expostas ocupacionalmente à ciclofosfamida independente da exposição ao tabaco. Em nosso estudo, também não foi observado efeito da exposição ocupacional na frequência de MN quando os indivíduos com história de CCT expostos e não expostos ocupacionalmente são comparados, o mesmo observou-se no grupo de indivíduos sem história de CCT. Além disso, não foi detectada diferença entre os grupos CCT e Controle, expostos e não expostos ocupacionalmente. Cabe ressaltar que neste estudo, a exposição ocupacional a substâncias tóxicas (solventes, praguicidas e derivados do petróleo) no grupo CCT foi avaliada em 18 indivíduos sem história atual de exposição e em 4 indivíduos com história atual. Entretanto, ressalta-se que os resultados referentes ao efeito do tabagismo na frequência de MN em populações ocupacionalmente ou ambientalmente expostas devem ser avaliados com cautela, pois é possível que a variável exposição “mascare” o efeito do tabagismo [Bonassi *et al.*, 2003].

Embora não tenha sido detectada diferença dos danos citogenéticos entre indivíduos não tabagistas e com história de tabagismo, Spruck III *et al.* [1993], avaliando mutações entre os éxons 5 e 8 do gene *TP53* em tumores de bexiga de indivíduos não tabagistas e ex-tabagistas observaram que embora a exposição ao tabagismo não altere significativamente o perfil de mutações neste gene; algumas alterações como mutações duplas foram observadas

exclusivamente nas amostras de tumor dos indivíduos com história de tabagismo, podendo contribuir no aumento da extensão dos danos no DNA das células uroteliais.

van Diemen *et al.* [1995], avaliando a frequência de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais (cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 15, 19 e X) em linfócitos de fumantes e não fumantes, não observaram diferenças entre os grupos em relação as frequências de aberrações estáveis (translocações) e não estáveis (cromossomos dicêntricos e em anel); muito embora tenha sido detectada um aumento significativo na frequência de hiperdiploidia, para todos os cromossomos estudados, no grupo de indivíduos tabagistas quando comparado aos indivíduos não-tabagistas.

Desta forma, fica claro que a exposição ao tabaco pode ocasionar alterações no DNA por diversas vias (mutações pontuais, aberrações cromossômicas numéricas, danos citogenéticos), entretanto, nossos resultados indicam que a história de neoplasia urotelial por si só está relacionado ao aumento de danos cromossômicos independente da exposição ao tabaco. Este aumento pode ser devido a danos cromossômicos *de novo*, representativos da instabilidade genômica. No entanto, não deve ser descartada a possibilidade de que células precursoras ou transformadas ainda abriguem alterações no DNA do urotélio de pacientes com história prévia de CCT.

Assim, o acompanhamento rigoroso e periódico dos pacientes com CCT de bexiga, após a ressecção do tumor primário, é um procedimento importante para a detecção precoce de recorrências e para intervenções que diminuam a morbidade e mortalidade pela doença. Nesse contexto, a análise da presença do micronúcleo em células esfoliadas da bexiga pode ser considerada uma ferramenta auxiliar, ao lado dos exames histopatológicos e

citopatológicos de rotina, para a detecção precoce da doença ou de recorrências e para o estabelecimento de estratégias de tratamento.

6. CONCLUSÃO

Os dados gerados neste estudo não evidenciaram efeito do tabagismo na frequência de micronúcleos. No entanto, os indivíduos com história de CCT não tabagistas apresentaram frequência aumentada de micronúcleo em células esfoliadas da bexiga, mesmo após a ressecção do tumor. Desta forma, supõe-se que o urotélio macroscopicamente normal destes indivíduos com história de CCT, ainda abriga células geneticamente instáveis que poderiam conferir um risco aumentado ao desenvolvimento neoplásico *de novo*. Portanto, o teste de micronúcleo pode ser considerado uma ferramenta auxiliar importante para os citopatologistas no diagnóstico de lesões recorrentes da bexiga, principalmente naquelas de baixo grau histológico de difícil avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bolognesi C, Perrone E, and Landini E. 2002. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguri, Italy. *Mutagenesis* 17: 391-397.

Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin Y, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M. 2003. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the HUMN Micronucleus project. *Mutat Res* 543: 155 – 166.

Buajeeb W, Kraivaphan P, Amornchat C, Triratana T. 2007. Frequency of micronucleated exfoliated cells in oral lichen planus. *Mutat Res* 627: 191–196.

Burgaz S, İşcan A, Büyükbingöl ZK, Bozkurt A, Karakaya AE. 1995. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. *Mutat Res* 335: 163 – 169.

Burgaz S, Karahalil B, Bayrak P, Taskin L, Yavuzaslan F, Bokesoy I, Anzion RB, Bos RP, Platin N. 1999. Urinary cyclophosphamide excretion and micronuclei frequencies in peripheral lymphocytes and in exfoliated buccal epithelial cells of nurses handling antineoplastics. *Mutat Res* 439(1):97 - 104.

Daniely M , Rona R, Kaplan T, Olsfanger S, Elboim L, Zilberstien Y, Friberger A, Kidron D, Kaplan E, Lew S and Leibovitch I. 2005. Combined analysis of morphology and fluorescence in situ hybridization significantly increases accuracy of bladder cancer detection in voided urine samples. *Urol* 66[6]: 1354-1359.

Denzinger S, Mohren K, Knuechel R, Wild PJ, Burger M, Wieland WF, Hartmann A, Stoehr R. 2006. Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses. *Human Pathol* 37: 143-157.

Frau DV, Usai P, Dettori T, Caria P, De Lisa A, Vanni R. 2006. Fluorescence in situ hybridization patterns in newly diagnosed superficial bladder lesions and corresponding bladder washings. *Cancer Genet Cytogenet* 169: 21–26.

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

Hamurcu Z, Dönmez-Altuntas H, Borlu M, Demirtas H and Asçioslu Ö. 2005. Micronucleus frequency in the oral mucosa and lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Dermatol* 30: 565–569.

Laudadio J, Keane TE, Reeves HM, Savage SJ, Hoda RS, Lage JM and Wolff DJ. 2005. Fluorescence in situ hybridization for detecting transitional cell carcinoma: implications for clinical practice. *BJU Int* 96: 1280-1285.

Lehutter-Michel MP, Di Giorgio C, Amara YA, Laget M, Botta A. 1995 The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: effect of smoking. *Mutagenesis* 10: 329-332.

Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Cebulska-Wasilewska A, Marcos R. 2001. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat Res* 495: 147 – 156.

Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S, Marcos R. 2003. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis* 2003 18: 249-258.

Reznikoff CA, Sarkar S, Jülicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA. 2000. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncol* 5: 191-203.

Speit G, Schmid O. 2006. Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. *Mut Res* 613: 1–9.

Spruck III CH, Rideout III WM, Olumi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC, Nichols PW, Horn T, Hermann G, Steven K, Ross RK, Yu MC and Jones PA. 1993. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res* 53: 1162 – 1166.

van Diemen PCM, Maasdam D, Vermeulen S, Darroudi F and Natarajan AT. 1995. Influence of smoking habit on the frequencies of structural and numerical chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes using the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. *Mutagenesis* 10(6): 487 – 495.

Wu P, Loh C, Hsieh L, Liu T, Chen C, Liou S. 2004. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. *Mutat Res* 562: 27–38.

Zeegers MPA, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt FBPA. 2004. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 21: 392–401



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 05 de setembro de 2.005

OF. 276/2005-CEP

*Ilustríssima Senhora
Profª Drª Maria Luíza Cotrim Sartor de Oliveira
Departamento de Patologia
Faculdade de Medicina de Botucatu,*

Prezada Drª Maria Luíza,

De ordem da Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto: Alterações cromossômicas em células uroteliais não neoplásicas esfoliadas de pacientes com história de carcinoma de células transicionais, de autoria de João Paulo Castro Marcondes, orientado por Vossa Senhoria, com a colaboração da Profª Drª Daisy Maria Fávero Salvadori, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05/09/2005

Situação do Projeto: APROVADO

Atenciosamente,


*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (VOLUNTÁRIO)

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

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1- Título do Protocolo da Pesquisa: "Alterações cromossômicas em células uroteliais esfoliadas de pacientes com história de carcinoma de células transicionais".
- 2- Pesquisadores responsáveis: Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira, Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, João Paulo de Castro Marcondes e Dr. José Goldberg (urologista responsável).
- 3- Avaliação de risco da Pesquisa: sem risco, visto que aproveitaremos parte do lavado já coletado pelo médico responsável, não havendo coletas adicionais unicamente para a pesquisa.

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

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

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

- 1- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?

[] SIM

[] NÃO

- 2- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.
[] SIM [] NÃO
- 3- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?
[] SIM [] NÃO
- 4- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUNESP por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 5- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 6- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 7- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?
[] SIM [] NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

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

_____, ____ de _____ de _____

ou

Paciente

Responsável

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

Nome: Dra Maria Luiza Cotrim Sator de Oliveira

Endereço: Depto. de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N,
Botucatu - SP

Telefone: (14) 3811-6238 (ramal – 215) / (14) 3882-8255

Nome: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Endereço: Depto. de Patologia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N,
Botucatu - SP

Telefone: (14) 3882-8255

Nome: João Paulo de Castro Marcondes

Endereço: Reinaldo Senger, 155 – Vila Pinheiro – Botucatu, SP

Telefone: (14) 3814-1463 / (14) 9126-7034 / (14) 3882-8255

Nome: Dr. José Goldberg

Endereço: Depto. de Urologia - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP Rubião Júnior S/N,
Botucatu – SP.

Telefone: (14) 3811-6271

Entrevista aplicada aos sujeitos da pesquisa:

“Alterações cromossômicas em células uroteliais esfoliadas de pacientes com história de carcinoma de células transicionais”.

Registro do paciente no estudo:.....
 Data: / /

I – Identificação

1 – Nome:
 2 – RGH:
 3 – Sexo [M] masculino [F] feminino.....
 4 – Profissão:
 5 – Data de nascimento: / /
 6 – Idade:

II – Antecedentes pessoais

1 – Fuma [S] sim [N] não.....
 2 – Há quanto tempo (anos)
 3 – Quantos cigarros/dia.....
 4 – Tipo [1] cachimbo [2] charuto [3] palha [4] papel c/ filtro [5] outros.....
 5 – Já fumou [S] sim [N] não.....
 6 – Há quanto tempo deixou de fumar (meses)
 7 – Quantos cigarros/dia.....
 8 – Durante quanto tempo fumou (meses)
 9 – Tipo [1] [2] [3] [4] [5]
 10 – Bebe [S] sim [N] não.....
 11 – Há quanto tempo (meses)
 12 – Tipo [1] cachaça [2] cerveja [3] whisky [4] vodka [5] vinho [6] outras.....
 13 – Quantidade/dia – No copos /dia
 14 – Já bebeu [S] sim [N] não.....
 15 – Tipo [1] [2] [3] [4] [5] [6]
 16 – Quantidade/dia – No copos /dia
 17 – Há quanto tempo deixou (meses)
 18 – Contato com substâncias tóxicas [S] sim [N] não.....
 19 – Quais
 20 – Por quanto tempo.....
 21 – Período sem contato com a(s) substância(s)
 22 – História de exposição à radiação [S] sim [N] não.....
 23 – Número de RX.....
 24 – Usa habitualmente algum tipo de medicação [S] sim [N] não.....
 25 – Quais [A] antibiótico [V] vitamina [AI] antiinflamatório [X] xarope [O] outros.....
 26 – Frequência/dia.....
 27 – Tipo.....
 28 – Já usou algum tipo de medicamento [S] sim [N] não.....
 29 – Quais [A] antibiótico [V] vitamina [AI] antiinflamatório [X] xarope [O] outros.....
 30 – Frequência/dia.....
 31 – Tipo.....
 32 – Há quanto tempo deixou (meses).....

unesp

DIVISÃO TÉCNICA ACADÊMICA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Seção de Pós-Graduação

Fis.
Proc.
Rub.

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - PABX (0xx14) 3811-6022

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "alterações cromossômicas em células mestelias nas neoplasias epiliadas de pacientes com história de carcinoma de célula transitória" aprovado pelo CEP em / / , teve seu título alterado para "Alterações cromossômicas em células mestelias^{epiliadas} de pacientes com história de carcinoma de célula transitória", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 05 / 02 / 2007

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) João Paulo de Castro Macedo

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) Maria Inez C. Chaves

Programa de Pós Graduação em Patologia

✓ Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP

Comitê de Ética em Pesquisa Comissão de Ética em Pesquisa - CEP
Resolução nº <u>05/02/07</u>
Alberto José Capellari Secretário CEP/CEEA