

LUÍS EDUARDO MURGEL DE CASTRO SANTOS

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS
DE *P53* NO CÂNCER DE BEXIGA**

CAMPINAS

2009

Luís Eduardo Murgel de Castro Santos

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DE *P53* NO CÂNCER DE BEXIGA

*Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Doutor em
Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.*

Orientadora: Laura Sterian Ward

**CAMPINAS
UNICAMP
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8.^a / 6044

Sa59a Santos, Luís Eduardo Murgel de Castro
Análise da influência dos polimorfismos de P53 no câncer de
bexiga / Luís Eduardo Murgel de Castro Santos. Campinas, SP : [s.n.],
2009.

Orientador : Laura Sterian Ward
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Genes P53. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Neoplasia de bexiga.
4. Susceptibilidde. I. Ward, Laura Sterian. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : The role of TP53 PRO47SER and ARG72PRO single nucleotide
polymorphisms in the susceptibility to bladder cancer

Keywords: • Gene P53
• Polymorphism, genetic
• Bladder neoplasm
• Susceptibility

Titulação: Doutor em Clínica Médica
Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:
Profª. Dra. Laura Sterian Ward
Prof. Dr. Ubirajara Ferreira
Prof. Dr. Athanase Billis
Prof. Dr. Antonio Roberto Franchi Teixeira
Prof. Dr. Enrico Ferreira Martins de Andrade

Data da defesa: 22-10-2009

Banca examinadora da tese de Doutorado

Luís Eduardo Murgel de Castro Santos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof. Dr. Enrico Andrade

2. Prof. Dr. Antonio Roberto Franchi Teixeira

3. Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

4. Prof. Dr. Athanase Billis

5. Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/10/2009

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais (Lycurgo e Sylvia), cuja educação, sentido de família – além do exemplo dele, como médico; e de ambos, como seres humanos – trouxeram-me até aqui. Espero que esta conquista me estimule a continuar minha missão na medicina, servindo de inspiração para meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a Deus por me mostrar o caminho. À minha família (Renata, Pedro e André), pelo estímulo e compreensão. À doutora Laura, pela confiança, ensino e apoio. Às meninas do laboratório (Kika, Natássia, Elaine, Janaína, Marjory, Maria, Juliana, Aline Castaldi, Aline Carolina, Marielly e Angélica), pelos ensinamentos e pela imprescindível ajuda técnica, que se estende também ao Renato e ao Éder. A Fabiana e ao Mário, que me incentivaram e me apresentaram ao GEMOCA. À FAPESP, pelo apoio financeiro. A meus pais, Lycurgo e Sylvia, e a meus irmãos, Luiz Felipe, Ana Teresa, Lycurgo e Ana Cristina. À amiga Kátia, pela cuidadosa editoração. Aos professores doutores Saul Gun, José Barreto, Alfio José Tincani, João José Fagundes, Ubirajara Ferreira, Athanase Billis, Antônio Roberto Franchi Teixeira e Enrico Ferreira Martins de Andrade. À equipe de estatística da FCM – UNICAMP. Aos pacientes e voluntários.

A verdade de hoje é uma variável sujeita à evolução do conhecimento, sugerindo-nos humildade.

“E se os cientistas [...] acham que basta amontoar saber, a ciência pode se transformar em aleijão [...] Com o tempo, é possível que vocês descubram tudo o que haja por descobrir, e ainda assim o seu avanço há de ser apenas um avanço para longe da humanidade. O precipício entre vocês e a humanidade pode crescer tanto que, ao grito alegre de vocês, grito de quem descobriu alguma coisa nova, responda um grito universal de horror.” – Galileu Galilei. In: Bertold Brecht. A vida de Galileu, 1939.

RESUMO

Vários estudos já investigaram a associação do polimorfismo do códon 72 de *P53* (*P53* Arg72Pro) a um risco aumentado para desenvolver câncer de bexiga, com resultados controversos. Aproveitando a diversidade étnica da população brasileira, nós genotipamos 94 indivíduos com câncer de bexiga (76 homens e 18 mulheres; idade 21 – 96 anos; 67 ± 13 anos; 79 fumantes e 15 não fumantes), que foram cuidadosamente pareados com 159 indivíduos controle (104 homens e 55 mulheres; idade 20 – 100 anos; 65 ± 21 anos; 33 fumantes e 126 não fumantes). A avaliação levou em conta exposição ambiental, fatores alimentares, história ocupacional, tabagismo, condições gerais de saúde e doenças prévias. O genótipo Arg/Pro foi menos frequente na população de pacientes e conferiu um risco 44% menor de câncer de bexiga. A análise de regressão logística univariada também identificou sexo masculino (OR = 6,87, 95% CI = 3,78 – 12,5; $P < 0,001$), idade acima de 65 anos (OR = 4,44, 95% CI = 2,56 – 7,71; $P < 0,001$), e tabagismo (OR = 18,61, 95% CI = 9,62 – 36,03; $P < 0,001$) como importantes fatores de risco para câncer vesical. No entanto, o genótipo *P53* Arg72Pro desapareceu como um fator de susceptibilidade numa análise de regressão multivariada e univariada ajustada para sexo, idade e tabagismo, sugerindo que estava conectada a um destes fatores na predisposição ao câncer de bexiga. Além disto, uma análise mais detalhada revelou que o alelo Pro foi menos frequente em pacientes com ≥ 65 anos (23, 88%) do que nos com < 65 anos (51,85%) ($P = 0,009$; $P = 0,029$). Todos os pacientes e controles apresentaram o tipo selvagem Pro no códon 47. Nós concluímos que *P53* Arg72Pro pode não constituir fator independente, mas sim ligado à idade na susceptibilidade ao câncer vesical.

ABSTRACT

Several studies have investigated the association between *P53* Arg72Pro and an increased risk of developing bladder tumors, with controversial results. Taking advantage of the high admixture rates in the Brazilian population, we genotyped 94 bladder cancer patients (76 males and 18 females; aged 21 – 96 years old; 67 ± 13 years old; 79 smokers and 15 nonsmokers) carefully paired with 159 controls (104 males and 55 females; aged 20 – 100 years old; 65 ± 21 years old; 33 smokers and 126 nonsmokers) with respect to environmental exposure, diet routine, lifetime occupational history, smoking history, general health conditions, and previous diseases. Arg/Pro genotype was under-represented in the patient population, and conferred a 44% lower risk of bladder cancer. Univariate logistic regression analysis also identified male sex (OR = 6,87, 95% CI = 3,78 – 12,50; $P < 0,001$), age over 65 years (OR = 4,44, 95% CI = 2,56 – 7,71; $P < 0,001$), and smoking habits (OR = 18,61, 95% CI = 9,62 – 36,03; $P < 0,001$) as important risk factors for bladder cancer. However, the *P53*Arg72Pro genotype disappeared as a susceptibility factor both in the multivariate regression analysis and in an univariate regression analysis adjusted for gender, age, and smoking, suggesting that it was connected with one of these factors in the predisposition to bladder cancer. Indeed, a further analysis demonstrated that both alleles and genotype variants of *P53*Arg72Pro are less frequent in older patients ($P = 0,029$). All the patients and control presented the wild-type Pro genotype at codon 47. We concluded that the effect of *P53*Arg72Pro, described in some studies as an important risk factor, may not be an independent, but an age-related factor of susceptibility to bladder cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Base Nitrogenada Adenina
Arg	Aminoácido Arginina
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
C	Base Nitrogenada Citosina
CI	Intervalo de Confiança. Do inglês: <i>Confidence Interval</i>
CYP	Enzima Citocromo P450
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
G	Base Nitrogenada Guanina
G	Grau de Diferenciação Tumoral (I, II, III)
GEMOCA	Laboratório de Genética Molecular do Câncer
GST	Enzima Glutathione S-Transferase
HC	Hospital de Clínicas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISUP	Do inglês: <i>International Society of Urothology</i>
kb	kilobase
NAT	Enzima N-Acetiltransferase
OR	Do inglês: <i>Odds Ratio (chance)</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Probabilidade
pb	pares de base
PCR	Reação de Polimerase em cadeia
PUCSP	Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Pro	Aminoácido Prolina
QTX	Quimioterapia
RFLP	Do inglês: <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RTU	Ressecção Trans-Uretral
RTX	Radioterapia
Ser	Aminoácido Serina
SEER	Do inglês: <i>Statistics, Epidemiology, and End Results Program</i>
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SNP	Do inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
T	Base Nitrogenada Timina
Taq	DNA Polimerase da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TNM	Do inglês: <i>Tumor, Nodes, Metastasis</i>
UICC	União Internacional contra o Câncer
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Luz ultravioleta. Do inglês: <i>Ultraviolet light</i>

LISTA DE TABELAS

		Páginas
Tabela 1	Classificação TNM de 2002	22
Tabela 2	Características dos grupos estudados	29
Tabela 3	Análise de regressão logística multivariada para câncer de bexiga	35
Tabela 4	Classificação e prognóstico dos tumores vesicais	36
Tabela 5	Resultados dos polimorfismos: controles x tumores	36
Tabela 6	Resultados dos polimorfismos quanto à classificação e prognóstico (superficial x profundo – $P = 0,634$)	36
Tabela 7	Frequência dos genótipos do códon 72 de <i>P53</i> em 94 pacientes com tumor e 159 controles	37
Tabela 8	Comparação dos polimorfismos 72 <i>P53</i> com idade ≥ 65 <. (Teste qui-quadrado) $P = 0,009$	37
Tabela 9	Comparação dos polimorfismos 72 <i>P53</i> com idade ≥ 65 <. (Teste exato de Fisher) $P = 0,029$	38

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
Figura 1	Radical ortoaminofenol	18
Figura 2	Estadiamento T dos tumores vesicais	21
Figura 3	Estrutura da proteína de <i>P53</i> com domínio funcional, incluindo interação da proteína no N-terminal e domínios de ligação da sequência de DNA	25
Figura 4	Ilustração da ativação e regulação da proteína de <i>P53</i> , incluindo interação com proteínas virais, produtos de oncogenes e efeitos regulatórios	25
Figura 5	PCR do códon 72 de <i>P53</i>	31
Figura 6	Restrição do códon 72 de <i>P53</i>	32
Figura 7	PCR do códon 47 de <i>P53</i>	32
Figura 8	Restrição do códon 47 de <i>P53</i>	33

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1	
Grau de diferenciação histológica dos tumores uroteliais vesicais. Comparação da Classificação da OMS 1973 e da OMS 2004 / ISUP 1998	22

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract.....	viii
Lista de abreviaturas	ix
Lista de tabelas	x
Lista de figuras	xi
Lista de quadros.....	xii
1. Introdução	15
2. Epidemiologia do câncer vesical	16
3. Fatores etiológicos do câncer vesical	18
3.1 Exposição ambiental.....	18
3.2 Alimentares.....	18
3.3 Medicamentosos	19
3.4 Outros fatores	19
3.5 Tabagismo	19
3.6 Genéticos	19
4. Estadiamento e tratamento do câncer vesical	21
5. O gene <i>P53</i>	24
6. O polimorfismo do códon 72 do gene <i>P53</i>	26
7. O polimorfismo do códon 47 do gene <i>P53</i>	27
8. Objetivo	28
9. Materiais e métodos.....	29
9.1 Casuística.....	29
9.2 Extração de DNA	30
9.3 PCR do códon 72 de <i>P53</i>	30
9.4 PCR do códon 47 de <i>P53</i>	32
9.5 Metodologia da análise estatística	33
10. Resultados.....	35
10.1 Análises dos dados clínicos dos pacientes.....	35
10.2 Resultados dos polimorfismos.....	36

11. Discussão	39
12. Conclusão	41
13. Referências bibliográficas	42
14. Anexo	
14.1 Termo de consentimento	49

INTRODUÇÃO

O câncer, juntamente com as doenças cardiovasculares, é a principal causa de morte nos países desenvolvidos. A cada ano, nos Estados Unidos da América (EUA), mais de um milhão de indivíduos descobrem que são portadores de algum tipo de câncer. De acordo com dados da American Cancer Society, calcula-se 1.479.350 casos novos de câncer, e aproximadamente 562.340 mortes para o ano de 2009 (<http://www.cancer.org>). No Brasil, dados do Ministério da Saúde calculam 466.730 novos casos de câncer para o ano de 2008 (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>). A incidência de câncer em 2008 (novembro) nos EUA foi de 11.384.892 casos. Destes, 527.496 localizavam-se na bexiga (<http://seer.cancer.gov>).

Diante desse quadro, algumas questões são óbvias: sabemos que a forma como vivemos aliada à carga genética, são fatores que irão determinar se teremos um câncer clínico ou não. Agentes químicos, poluição ambiental, fatores presentes na fumaça do cigarro, tipo de alimentação etc. podem promover o aparecimento de células neoplásicas (1). Quando nosso organismo detecta um crescimento defeituoso de células, aciona alguns genes, como o *P53* – classificado como gene supressor de tumores, capaz de parar o ciclo celular, permitindo o reparo do material genético lesado, ou ainda provocar a morte da célula defeituosa, induzindo-a à apoptose (1, 2). É com base nessas considerações, que damos início ao nosso estudo.

EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER VESICAL

O tipo histológico mais frequente é o carcinoma de células transicionais (câncer urotelial), o qual corresponde a cerca de 90 % dos casos (3). Nos Estados Unidos, calcula-se 70.980 novos casos de câncer de bexiga para 2009; e 14.330 mortes por ele (<http://www.cancer.org>). No Brasil dispomos de poucos dados estatísticos. Sabe-se, porém, que no ano de 2000 houve cerca de 2015 mortes por câncer vesical (INCA).

Ele é 2,5 vezes mais frequente em homens do que em mulheres, talvez por uma maior exposição a fatores ambientais. Porém, uma recente publicação demonstrou – experimentalmente em ratos – uma forte associação de tumores vesicais a andrógenos e receptores androgênicos, o que nos permite aventar uma outra hipótese para essa maior frequência de tumores vesicais no sexo masculino (4). É o quarto em incidência nos homens, após o câncer de próstata, de pulmão e colo retal, o que corresponde à cerca de 6,2% de todos os cânceres (5). Nas mulheres é o oitavo, o que equivale a 2,5 % (5). A incidência tem aumentado nas últimas décadas (5). É mais frequente na raça branca do que na negra (duas vezes para homens americanos e 1,5 vezes para mulheres), apesar de que, na raça negra, costumam ocorrer formas mais agressivas (6). Já na população hispânica americana, a incidência é a metade da dos brancos nos dois sexos (7). A maioria dos casos diagnosticados é de formas superficiais do tumor, cujo tratamento é a ressecção transuretral, não ocorrendo metástases ou mortes. As recidivas, no entanto, são comuns. Por isto a prevalência é alta, sendo o segundo mais frequente no americano de meia idade e idoso, atrás apenas do câncer de próstata (8). Estima-se que nos EUA, em 2000, houve 8.100 casos de morte por câncer de bexiga em homens e 4.100 em mulheres, o que corresponde a 2,9 e 1,5 % das causas de morte por câncer (5). A sobrevida em cinco anos é melhor nos homens do que nas mulheres; na raça branca do que na negra. Esta diferença de sobrevida entre os sexos é mais evidente ainda na raça negra (sobrevida de cinco anos: homens brancos americanos, 84%, mulheres brancas americanas, 76%, homens afro-americanos, 71%, mulheres afro-americanas, 51%) (6). Acredita-se que esta disparidade de comportamento do tumor entre os brancos e os afro-americanos se deva, pelo menos em parte, a um diagnóstico mais tardio nestes últimos e a uma maior taxa de tumores mais agressivos nesta população (6). Comparando-se a sobrevida por estágio no momento do diagnóstico, ela também é mais favorável aos brancos, sugerindo que fatores genéticos devem agir desfavoravelmente nos afro-

americanos, além de, talvez, eles terem um menor acesso aos melhores tratamentos (5, 6, 9). Quanto aos hispânicos, além da menor incidência, eles têm uma sobrevida melhor que a dos brancos (9).

A incidência da doença tem aumentado nas últimas décadas (50% desde 1950), em parte devido ao aumento da expectativa de vida. A mortalidade, no entanto, decaiu, em virtude dos diagnósticos mais precoces e de melhores formas de tratamento (diminuiu 33% nos últimos 30 anos) – Statistics, Epidemiology, and End Results Program (SEER), 1973 – 1997. Ao analisarmos as taxas de mortalidade entre os sexos, ajustadas para idade, nos últimos 10 anos, houve um pequeno incremento para as mulheres, o que reforça a suposição de que fatores ligados ao sexo (hormonais, genéticos, tipo de vida) devem influenciar nas características biológicas do tumor (SEER, 1973 – 1997).

O câncer de bexiga pode ocorrer em qualquer fase da vida, mesmo em crianças, mas é mais frequente no idoso, com idade média, no diagnóstico, de 69 anos para homens e 71 anos para mulheres (6). A incidência aumenta com a idade, bem como a mortalidade (SEER, 1973 – 1997). Nos adolescentes e adultos jovens, o tumor tende a ser menos agressivo (10, 11).

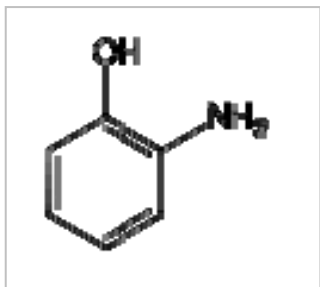
Existem diferenças de incidência entre países e regiões. Estudos demonstram que é mais frequente nos EUA e Inglaterra do que no Japão e Finlândia (12), sugerindo que fatores ambientais e raciais (genética) são importantes. A Espanha é o país com maior incidência mundial do carcinoma urotelial, talvez devido ao cigarro; já o Egito tem a maior incidência de carcinoma epidermóide (devido à bilharziose, *Schistosoma haematobium*) (13).

Dados de autópsia demonstram que muito raramente o câncer de bexiga é encontrado de forma incidental (14, 15, 16), como no caso de próstata (17) e rim (18). Isto demonstra que o tempo de latência do tumor é pequeno (fase em que ele é clinicamente indetectável até o momento da apresentação clínica) (3). Daí a importância de conseguirmos definir uma população de risco, por meio de novos marcadores de predisposição ao câncer, e assim submeter estes indivíduos a exames periódicos para um diagnóstico precoce (cistoscopia, análise de urina etc.).

FATORES ETIOLÓGICOS DO CÂNCER VESICAL

Cerca de 30 a 60 % dos casos dos cânceres vesicais estão associados a um fator etiológico (3). Carcinógenos inalados, absorvidos pela pele ou pelo trato digestivo, poderão ser excretados em altas concentrações pela urina, o que provoca tumorigênese de contato nas células uroteliais. A primeira associação do câncer vesical a um fator causal foi observada na Alemanha em 1895, em trabalhadores de indústrias químicas, nas quais se constatou, por Hunstein e Rehn (19), uma maior incidência da patologia. O fator etiológico mais importante é o tabagismo. Observou-se que muitos dos carcinógenos envolvidos no câncer vesical apresentam em comum o radical ortoaminofenol (figura 1), composto por um anel benzênico com um radical hidroxila e um amina. Os seguintes compostos possuem este radical: metabólitos do triptofano (endógeno), 2-naftilamina, benzidina, xenilamina e 4-nitrodifenil (exógenos) (20, 21).

Figura 1 Radical ortoaminofenol



3.1 Exposição ambiental

O corante anilina (fábrica de corantes) (3, 19); o 4-aminodifenil (benzeno) (22); os aldeídos (acroleína – fábrica de corantes e borracha) (23); os hidrocarbonetos alifáticos clorados; os gases e fuligem de carvão (24); o arsênico (água contaminada – doença do “pé-negro”, Taiwan) (25, 26).

3.2 Alimentares

Os nitritos e nitratos – nitrosaminas (27); o uso de adoçantes artificiais, contendo ciclamato e sacarina (controverso) (28, 29); metabólitos do triptofano (controverso) (30).

3.3 Medicamentosos

O abuso de analgésicos (fenacetina, um precursor do paracetamol, cuja estrutura é similar à da anilina) (31); a ciclofosfamida (imunossupressor cujo metabólito é a acroleína) (32); a erva chinesa *Aristolochia fangchi* (utilizada como redutora de peso) (33).

3.4 Outros fatores

A cistite crônica (34), uso prolongado de sondas (35), infecção pelo HPV (imunocomprometidos) (36), infecção pelo *Schistosoma haematobium* (bilharziose, Egito) (20), radioterapia pélvica (37), transplantados renais (imunossupressão) (38), baixa ingesta hídrica (39), retenção urinária crônica, bexiga neurogênica (3). Estudos demonstram não haver correlação com o uso de café e chá (40).

3.5 Tabagismo

O hábito de fumar cigarros aumenta em até quatro vezes o risco para câncer de bexiga. Isto está relacionado com o número de cigarros consumidos, o tempo de tabagismo e o grau de inalação da fumaça (12, 41). Ex-tabagistas terão seu risco para câncer de bexiga normalizado após 20 anos sem o vício (42). Outras formas de uso de tabaco causam menor risco para câncer de bexiga (41). Não se sabe ao certo qual agente químico carcinógeno presente na fumaça do cigarro é o responsável pelo câncer de bexiga. Nitrosaminas, 2-naftilamina e 4-aminodifenil, além de metabólitos do triptofano estão presentes em tabagistas (43).

3.6 Genéticos

Não existe um consenso em relação à hereditariedade no câncer vesical. Assim, enquanto um estudo na Islândia demonstrou pouca associação com descendentes de primeiro grau de pacientes portadores de câncer vesical (44), outro estudo espanhol revelou uma incidência até 2,5 vezes maior (45). Isto poderia explicar a associação de câncer vesical com alguns polimorfismos herdados de genes envolvidos no controle do ciclo celular e em enzimas de detoxificação (*NAT2*, *NAT1*, *CYP1A2*, *GSTM1*) cuja distribuição está fortemente relacionada a fatores étnicos (3, 46).

Contudo, fatores adquiridos parecem desempenhar o principal papel na gênese do câncer vesical, como mutações nos genes de supressão tumoral, nos protooncogenes (tornando-os oncogenes) e em genes que controlam fatores de crescimento.

Oncogenes da família do *RAS*, que codificam a proteína *P21* foram associados ao tumor vesical de alto grau histológico (47, 48). A hiperexpressão de genes responsáveis pelo fator de crescimento da epiderme (EGF), como *ERBB1* e *ERBB2*, estão associadas ao desenvolvimento e progressão dos tumores vesicais. (49).

O principal gene supressor tumoral envolvido no câncer vesical é o *P53*, que será discutido mais adiante; porém, outros também foram associados, como o *RB* (retinoblastoma) e os responsáveis pelas proteínas P21, P27 e P16 (3). As alterações nos genes supressores tumorais estão associadas a tumores mais agressivos, enquanto deleções no braço longo do cromossomo 9 estão associadas a tumores superficiais e de baixo grau (3).

ESTADIAMENTO E TRATAMENTO DO CÂNCER VESICAL

Os tumores vesicais são classificados quanto ao estadiamento, de acordo com a normatização TNM de 2002 (UICC) (50) (tabela 1). Cerca de 90% são carcinomas de células transicionais. São superficiais quando atingem, no máximo, a lâmina própria do epitélio vesical (PTA e PT1); e profundos, quando invadem a muscular própria ou adiante (PT2, PT3 e PT4) (figura 2). Podem causar metástases linfonodais (N) ou à distância (M). Além disso, podem ser bem diferenciados (GI), moderadamente diferenciados (GII) ou com baixo grau de diferenciação (GIII), de acordo com a análise histológica tumoral (OMS – 1973). Esta classificação – de 1973 – foi recentemente atualizada (ISUP 1998 e OMS 2004), porém seu uso rotineiro ainda não foi adotado (quadro 1).

Figura 2 Estadiamento T dos tumores vesicais

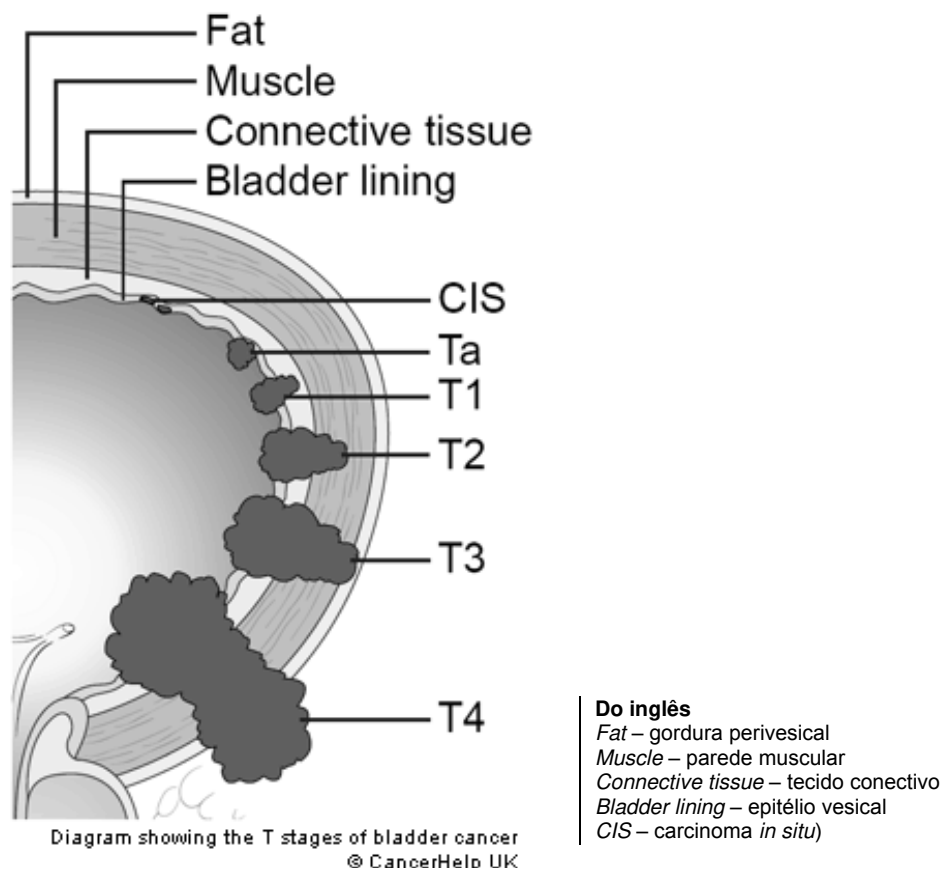
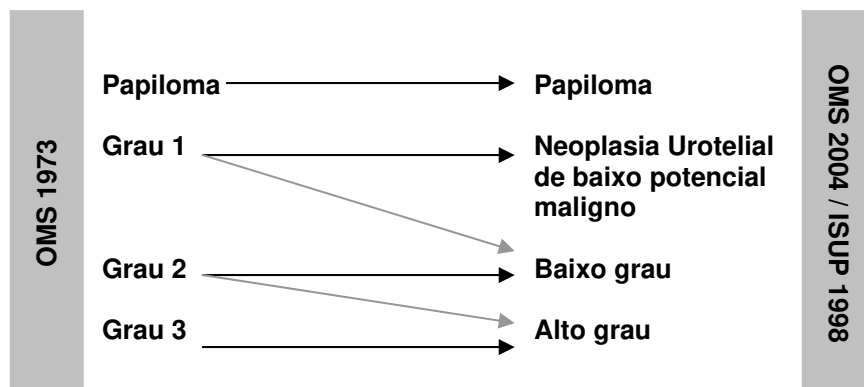


Tabela 1 Classificação TNM de 2002

BEXIGA	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Ta	Carcinoma papilífero não invasivo
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> “tumor plano”
T1	Tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial
T2	Tumor que invade músculo
T2a	Tumor que invade a musculatura superficial (metade interna)
T2b	Tumor que invade a musculatura profunda (metade externa)
T3	Tumor que invade tecido perivesical
T3a	microscopicamente
T3b	macroscopicamente (massa extravesical)
T4	Tumor que invade qualquer uma das seguintes estruturas: próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal
T4a	Tumor que invade próstata, útero ou vagina
T4b	Tumor que invade parede pélvica ou parede abdominal
N – LINFONODOS REGIONAIS	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase, em um único linfonodo, com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	Metástase, em um único linfonodo, com mais de 2 cm até 5 cm em sua maior dimensão, ou em múltiplos linfonodos, nenhum com mais de 5 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 5 cm em sua maior dimensão
M – METÁSTASE À DISTÂNCIA	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Quadro 1 Grau de diferenciação histológica dos tumores uroteliais vesicais. Comparação da Classificação da OMS 1973 e da OMS 2004 / ISUP 1998



Adotamos a normatização da Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) (2005) para tratamento dos tumores vesicais (51). Os superficiais geralmente são tratados por meio de ressecção transuretral (RTU), seguida de instilação vesical de Onco-BCG para casos recidivados e/ou multifocais e/ou PT1. Geralmente aplica-se também uma dose única de 40 mg intravesical de mitomicina C, um quimioterápico com efeito tópico, nas primeiras 24 horas após a RTU, para prevenir recidivas e implantes. A finalidade do Onco-BCG é também a de prevenir recidiva. Não existe um consenso quanto ao esquema de utilização do Onco-BCG. Utilizamos, geralmente, um mês após a RTU, na dose de 40 mg (cepa liofilizada do Instituto Butantã), uma vez por semana, por seis semanas; e, após, uma vez ao mês, por 12 meses. No segundo ano, ele é aplicado trimestralmente; no terceiro, semestralmente; e, no quarto e quinto, anualmente. Os pacientes com tumores superficiais são assistidos com exames de cistoscopia, ultra-sonografia, urografia excretora e citologia oncológica urinária periódicos. No caso de recidiva, é realizada nova RTU com reestadiamento e novo ciclo de tratamento. O tumor de bexiga, quando superficial, não evolui com metástases.

Já nos tumores profundos, após a RTU, o tratamento clássico é a cistectomia radical com linfadenectomia pélvica e derivação urinária externa continente ou incontinente, ou substituição vesical. De acordo com o estadiamento, utiliza-se a quimioterapia (QTX); e, opcionalmente, a radioterapia (RTX). Em alguns casos específicos, pode-se realizar uma cistectomia parcial da área tumoral e, excepcionalmente, somente RTU seguida de QTX e/ou RTX. Os pacientes também são assistidos com exames de imagem periódicos.

O GENE *P53*

A proteína do *P53* foi descoberta em 1979, e inicialmente pensou-se que era codificada por um oncogene. Em verdade, porém, tratava-se da proteína produzida pelo *P53* mutado (52). O *P53* passou a ser considerado um gene supressor de tumores a partir de 1989, quando se demonstrou que o tipo selvagem de *P53* era capaz de inibir a transformação maligna de células e o crescimento de linhagens defeituosas, por meio de sua proteína normal (53, 54).

Esse é considerado o mais importante gene supressor de tumores nos seres humanos. Cerca de metade das neoplasias malignas apresentam mutações no *P53* (55). O câncer de cólon apresenta a frequência mais alta de alterações. Em relação aos cânceres genitourinários, o de próstata e bexiga são os que mais apresentam mutações (56).

O gene *P53* localiza-se no cromossomo 17 locus p13.1. É composto por 11 exons que, combinados, produzem 2,2 a 2,5 kb de RNA mensageiro. As alterações mais frequentes são as mutações por alteração na sequência das bases, o que resulta numa proteína defeituosa (57). A proteína normal do *P53* contém 393 aminoácidos (figura 3). Sua concentração celular é baixa, pois ela tem uma meia-vida de 20 minutos. Boa parte da proteína está sob forma latente, necessitando de mecanismos para sua ativação, como hipóxia, dano ao DNA e baixas concentrações de trifosfato de ribonuclease (figura 4) (57, 58, 59). Uma vez ativada, a proteína do *P53* poderá realizar as seguintes funções: regulação do ciclo celular (60), apoptose (61), senescência celular (62), regulação da angiogênese (63) e ainda interação com proteínas virais (64), produtos de oncogenes (65) e fatores de transcrição (66). Com isto, evita-se que linhagens de células cancerígenas se multipliquem.

A mutação do *P53* por alteração da sua sequência irá prolongar a meia-vida da proteína, o que provoca uma hiperexpressão nuclear, que pode ser determinada por diversas técnicas de imunohistoquímica. Apesar de ela ser hiperexpressa, não é eficiente, pois a sua estrutura foi alterada. Deve-se salientar que cerca de 20% das mutações ocorrem por deleção, e isto pode causar a ausência de produção da proteína – às vezes erroneamente interpretada como ausência de mutação (falso negativo). Em algumas situações, o contrário também pode ocorrer: há uma hiperexpressão da proteína do *P53* sem haver mutações, o que dá um resultado falso positivo (66).

Diversos trabalhos já constatarem que a presença de hiperexpressão da proteína do *P53* em câncer de bexiga correlaciona-se fortemente com progressão tumoral e casos mais avançados e de pior prognóstico (67, 68, 69). Não existe, porém, um consenso em relação ao BCG, radioterapia e quimioterapia envolvendo o *P53* e câncer de bexiga (66).

Estudos têm demonstrado, também, que alguns polimorfismos do gene *P53* selvagem, como o do códon 72, podem estar relacionados ao desenvolvimento de vários tumores, dentre os quais o câncer de bexiga.

Figura 3 Estrutura da proteína de *P53* com domínio funcional, incluindo interação da proteína no N-terminal e domínios de ligação da sequência de DNA.

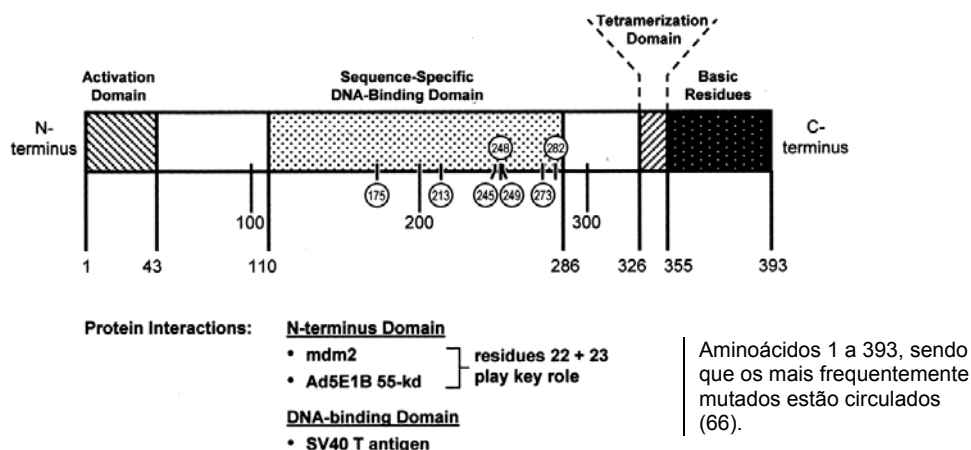
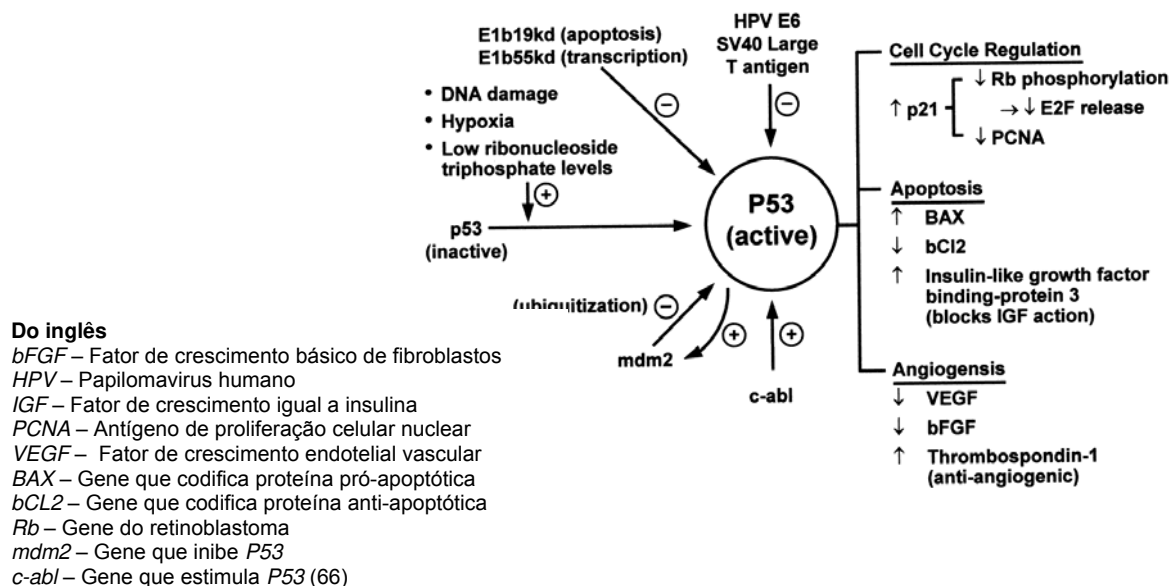


Figura 4 Ilustração da ativação e regulação da proteína de *P53*, incluindo interação com proteínas virais, produtos de oncogenes e efeitos regulatórios.



O POLIMORFISMO DO CÓDON 72 DO GENE *P53*

Os polimorfismos, que incluem os SNP (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*), constituem outro tipo de alteração genética. Os SNP são substituições de um único nucleotídeo na sequência de DNA. Os polimorfismos diferenciam-se das mutações porque ocorrem com maior frequência na população (>1%), além das mutações estarem associadas a um fenótipo mais grave, com uma disfunção evidente. Geralmente os SNP não estão associados a um fenótipo característico. Podem, porém, mudar a sequência da proteína, e se manifestarem, em alguns casos, por uma suscetibilidade a determinados tipos de tumores, eventualmente agravada por fatores externos (70).

As características estruturais de *P53* (códon 61 – 94) têm sido bem preservadas por toda evolução. No códon 72, no entanto, foi reconhecido um polimorfismo com substituição do resíduo de arginina (Arg) por prolina (Pro) no tipo selvagem do *P53* (71). Uma simples troca de base (de CGC para CCC, guanina por citosina) é responsável por tal mudança (72). A frequência do alelo prolina parece estar ligada à raça e à exposição aos raios ultravioleta. Ele chega a ocorrer em até 63% de africanos da Nigéria, mas foi detectado em apenas 17% de europeus da Suécia (73). Tem-se atribuído ao polimorfismo do códon 72 um papel de vulnerabilidade a diferentes carcinógenos. O genótipo Pro/Pro tem até 15 vezes menos chance de provocar apoptose quando comparado ao Arg/Arg (74). Wang et alii mostraram que pacientes com câncer de pulmão e genótipo Pro/Pro tendem a ter pior prognóstico do que indivíduos Arg/Pro (75). Boltze et alii constataram que pacientes com carcinoma anaplásico de tireóide também apresentaram, em 100% dos casos, genótipo Pro/Pro. E mais: que os genótipos Arg/Arg e Pro/Pro tinham uma prevalência significativa em pacientes com metástases de outros tipos de carcinoma de tireóide (76). Granja et alii, em trabalho do grupo do Laboratório de Genética Molecular do Câncer da UNICAMP – GEMOCA, recentemente publicaram um artigo mostrando que indivíduos com genótipo Pro/Pro têm uma maior chance de desenvolver câncer de tireóide (77). Morari et alii, do mesmo grupo, encontraram uma maior associação do genótipo Arg/Pro em câncer de ovário (78).

Em relação ao câncer vesical, há controvérsias; e os relatos da literatura são poucos, bem como de difícil interpretação (79, 80, 81). Por isto, a importância de se analisar este polimorfismo no câncer de bexiga, e em especial em nossa população, na qual tal tipo de investigação nunca foi reportada.

O POLIMORFISMO DO CÓDON 47 DO GENE *P53*

Recentemente, Li et alii (82), que realizaram estudos prévios sobre o códon 72 (74), descreveram que o polimorfismo do códon 47 do gene *P53*, que ocorre em menos de 5% dos afro-americanos (e ainda não descrito em caucasianos), pode ser funcionalmente significativo. Este polimorfismo foi identificado pela primeira vez por Gerwin (83). A troca de base CCG para TCG, citosina por timina, causa uma substituição de prolina (Pro) por serina (Ser). O resíduo de prolina é necessário para ativar a fosforilação da serina 46, envolvida no processo de apoptose. Isto faz com que indivíduos com esta mutação tenham até cinco vezes menos capacidade de provocar apoptose (82). Além disto, esta variante diminui a capacidade de transativar dois genes alvos do *P53*, o *P53AIP1* e o *PUMA* (*P53 upregulated modulator of apoptosis*) (82).

Não existem trabalhos clínicos, ainda, correlacionando o polimorfismo do códon 47 com câncer vesical. Como esta alteração foi verificada em afro-americanos, poderia haver alguma correlação dela com uma porcentagem maior de casos de câncer de bexiga mais agressivos e de piores prognósticos verificados nesta raça.

8

OBJETIVO

1. Analisar a prevalência dos polimorfismos dos códons 47 e 72 do gene *P53* em pacientes portadores de câncer de bexiga.
2. Comparar a incidência destes polimorfismos com indivíduos controles.
3. Avaliar a relevância destes polimorfismos em relação à incidência da doença, bem como o prognóstico destes pacientes.
4. Avaliar sua correlação com outros fatores conhecidos de risco para câncer de bexiga, como raça, sexo e tabagismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Casuística

Os pacientes que concordaram em participar deste estudo foram informados e orientados acerca do mesmo, bem como assinaram um termo de consentimento informado, conforme as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP (anexo). Coletamos amostras de sangue periférico de 114 pacientes portadores de tumor vesical, provenientes do Serviço de Urologia da Santa Casa de Misericórdia de Campinas, do Serviço de Urologia da PUCSP Campus Sorocaba e do Serviço de Oncologia do HC da UNICAMP. Destes pacientes, 94 foram selecionados para o presente estudo, por serem uroteliais e apresentarem seguimento suficiente para determinação da evolução. As suas características estão reunidas abaixo (tabela 2), juntamente com 159 indivíduos controle.

Tabela 2 Características dos grupos estudados

Grupo	Idade (anos)				Raça		Sexo		Tabagismo	
	Mín.	Máx.	Média	Mediana	Branca	Não branca	Masculino	Feminino	Sim	Não
Tumor = 94	21	96	67±13	70	84	10	76	18	78	16
Controle = 159	20	100	65±21	53	128	31	104	55	33	126

Os pacientes foram assistidos por um período que variou de 12 a 64 meses, com média de 19 meses. Todos foram inicialmente submetidos à ressecção transuretral do tumor (RTU) e, após, foram estadiados com uso dos resultados anatomopatológico, ultrassonografia e/ou tomografia computadorizada de abdome total, radiografia de tórax, urografia excretora e, alguns, com cintilografia óssea. Histologicamente, todos eram carcinoma de células transicionais, sendo que quatro apresentavam carcinoma *in situ* associado e três pacientes apresentavam diferenciação epidermóide no tumor.

Dividimos os pacientes em dois grupos: Tumores Superficiais (PTA ou PT1) e Tumores Profundos (PT2 ou mais), de acordo com a normatização TNM de estadiamento.

Cada grupo foi dividido, ainda, em indivíduos com bom prognóstico e com prognóstico ruim, de acordo com as características abaixo:

1. Tumores Superficiais com Bom Prognóstico: PTA GI ou GII, com ou sem recidivas.
2. Tumores Superficiais com Prognóstico Ruim: PT1 GII ou GIII, com ou sem recidivas.
3. Tumores Profundos com Bom Prognóstico: PT2N0M0, curados.
4. Tumores Profundos com Prognóstico Ruim: PT2 ou mais N qualquer M qualquer, sem possibilidade de cura, ou que evoluíram com recidivas, e/ou metástases, e/ou óbito pela doença.

9.2 Extração de DNA

Após a coleta do sangue periférico em tubo com tampão EDTA, extraímos o DNA por meio do método Fenol / Clorofórmio (padronizado no laboratório GEMOCA), num prazo de um a sete dias após a coleta. Primeiramente realizamos a lise de hemácias com tampão especial (NaCl 10 mM; MgCl₂ 5mM; Tris-HCl 10mM; pH 7,5; Uréia). Foi associado SDS (20%) e a solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. O processo de purificação foi realizado com Fenol Saturado com Tris e Clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A precipitação foi feita com Acetato de Sódio (3M), etanol 70% e 100%. O material extraído foi ressuspenso com tampão TE (Tris 10mM e EDTA mM).

O DNA, então, foi armazenado em congelador a -20°C até a realização das PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*). Após o processo de extração do DNA, realizou-se uma quantificação em espectrofotômetro, sendo consideradas adequadas amostras que apresentavam resultado entre 260/280 nm.

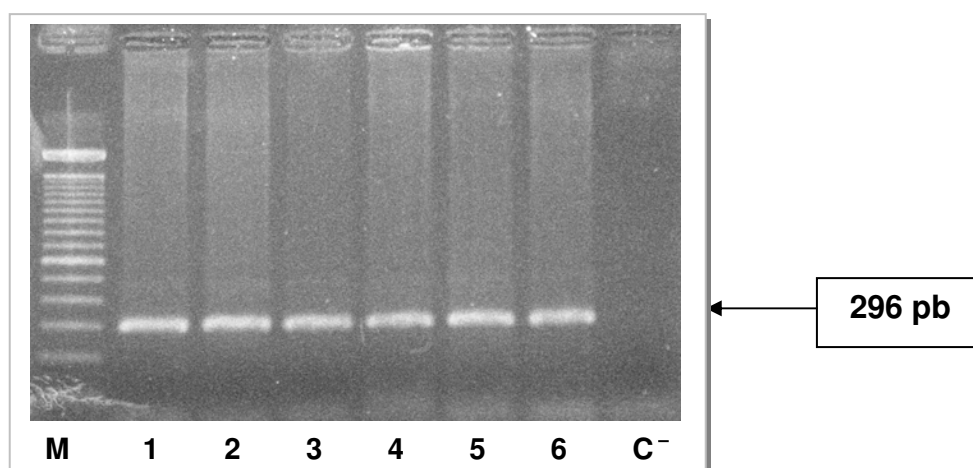
9.3 PCR do códon 72 de P53

Houve dificuldade para detectar o alelo Pro do códon 72 de P53 pela técnica alelo-específica, inicialmente proposta, e que havia sido realizada no laboratório GEMOCA em tumores de tireóide (84). Isto nos motivou a procurar uma nova técnica mais efetiva e com maior acurácia. Empregamos, então, a técnica descrita por Aral et alii em recente estudo de 2006 (85). Trata-se de um ensaio de RFLP (do inglês: *Restriction Fragment Length Polymorphism*), de que nos utilizamos com algumas adaptações. Inicialmente, um fragmento de 296 pares de base (pb) foi amplificado por meio de PCR, com os *primers sense*: (5-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3) e *anti-sense*: (5-GCAACTGACCGTGCAAGTCA-3). Cada 50 µl de solução da PCR continham 0,1 µg de DNA genômico, 0,6 U Taq DNA polimerase, 10 pmol de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP e 1,5 mM de cloreto de MgCl₂. As reações de amplificação consistiram de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos,

temperatura de *annealing* de 65°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto; uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos e uma etapa para a extensão final da fita a 72°C por 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas no termociclador MJ PTC – 200 PCR *system*.

Os produtos de PCR foram, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, visibilizados sob luz ultravioleta (UV) e fotografados com um sistema de foto documentação (figura 5).

Figura 5 PCR do códon 72 de *P53*

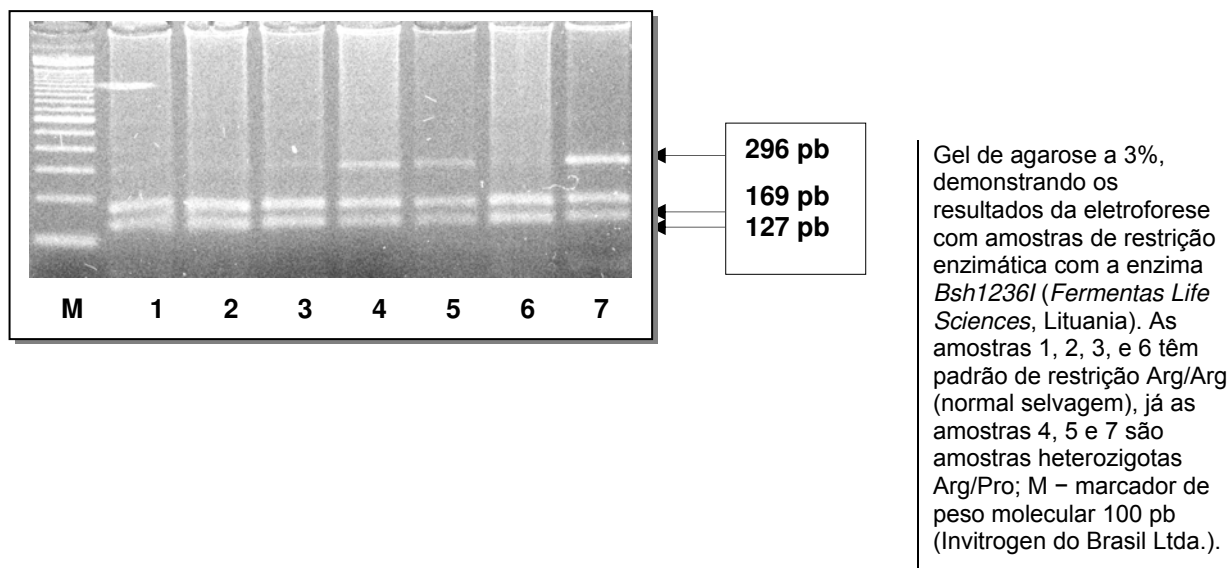


Gel de agarose a 2%, demonstrando os resultados da eletroforese com amostras de PCR. M – marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen do Brasil Ltda.). C⁻ – controle negativo.

RFLP foi realizada com 5 µl da reação de PCR de cada amostra que foram incubadas a 37° C por 16 horas com 10 µl da enzima de restrição *Bsh1236I* (*Fermentas Life Sciences*, Lituania) em um meio tamponado, contendo 10 mM tris, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA pH 8.5. O produto desta restrição foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3% corado e fotografado pelo padrão já descrito.

A presença do alelo selvagem, arginina, foi indicada pela presença das bandas de 169 e 127 pb, enquanto a ausência de digestão (296 pb) foi observada no alelo polimórfico prolina. O alelo heterozigoto é indicado pela presença das três variantes de peso 296, 169 e 127 pb (figura 6).

Figura 6 Restrição do códon 72 de *P53*

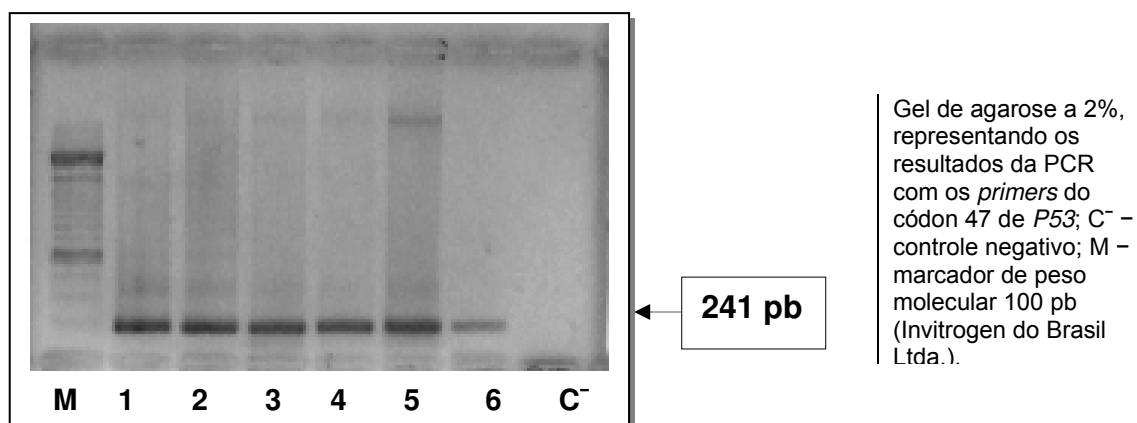


9.4 PCR do códon 47 de *P53*

Para a identificação do polimorfismo no códon 47 do gene *P53* utilizamos um ensaio de PCR-RFLP com os seguintes *primers*:

5' CACCCATCTACAGTCCCCC3' / 5' ACCGTAGCTGCCCTGGTAG3' que amplificam um fragmento de 241pb (82). As reações de amplificação consistiram de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de *annealing* de 60°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto; uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos e uma etapa para a extensão final da fita a 72°C por 10 minutos. As reações de PCR foram realizadas no mesmo termociclador já descrito, e o produto analisado em gel de agarose a 2% (figura 7).

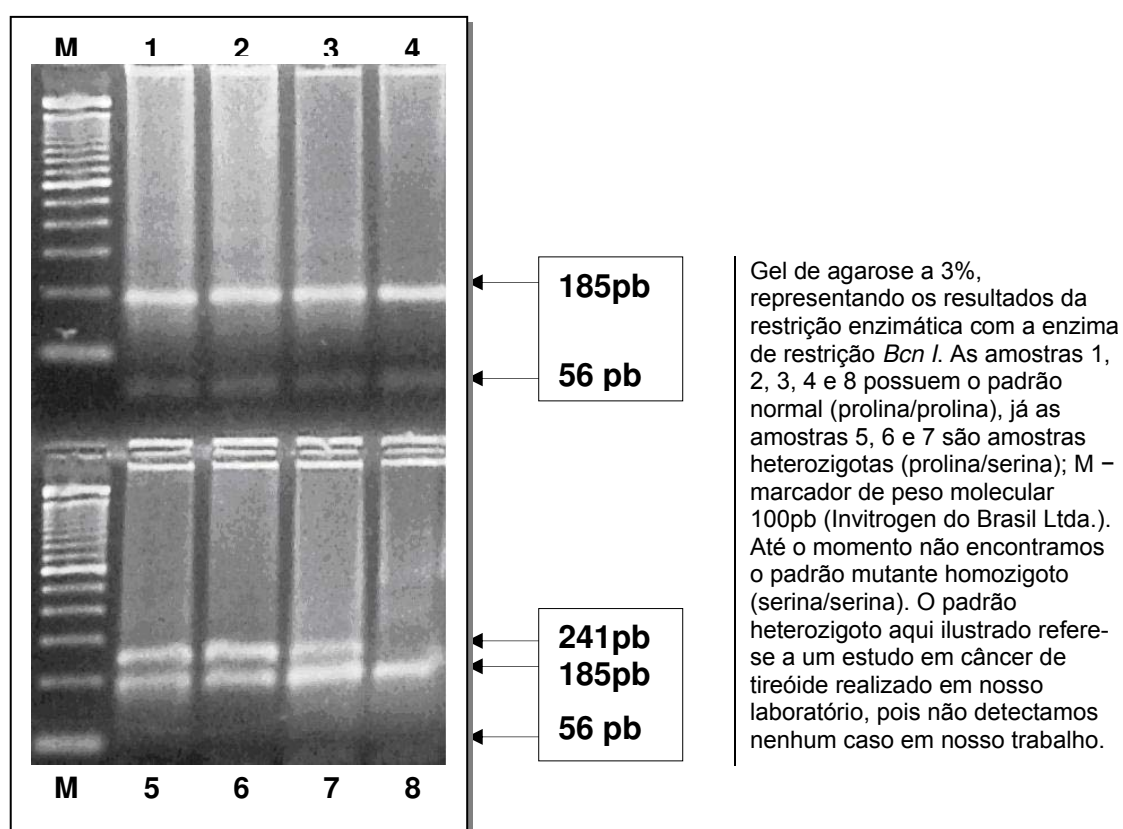
Figura 7 PCR do códon 47 de *P53*



RFLP foi realizada com 10 µl da reação de PCR de cada amostra, que foram incubadas a 37° C por 16 horas com 10 µl da enzima de restrição *Bcn I* (CauII) (*Fermentas Life Sciences*, Lituania) em um meio tamponado, contendo 10 mM tris, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA pH 8.5. O produto desta restrição foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3%.

A digestão do fragmento pela enzima em 185 e 56 pb demonstra o alelo normal prolina. Já a ausência revela o alelo selvagem serina (Figura 8).

Figura 8 Restrição do códon 47 de *P53*



9.5 Metodologia da análise estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (sexo, etnia, idade, tabagismo, estadiamento e prognóstico), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e estatísticas descritivas (com medidas de posição e dispersão – média, desvio-padrão, valores mínimo, máximo e mediano) da variável contínua (idade).

Para analisar a associação entre duas variáveis categóricas foram utilizados os testes qui-quadrado ou exato de Fisher (para valores esperados menores que cinco). Para comparar a variável numérica entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e entre três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Para analisar a influência conjunta dos genótipos e demais variáveis de interesse no câncer de bexiga, foi utilizada a análise de regressão logística, modelos univariado e multivariado com critério *Stepwise* de seleção de variáveis. Em seguida, foi feito o cálculo do poder da amostra, fixando alfa (erro tipo I) em 5%.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0,05$).

Para análise estatística foi utilizado o programa computacional *SAS for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 9.1.3. *SAS Institute Inc.*, 2002 – 2003, Cary, NC, USA.

RESULTADOS

10.1 Análises dos dados clínicos dos pacientes

Nossos dados epidemiológicos (tabela 3) foram similares aos descritos na literatura. As variáveis sexo, idade e tabagismo foram significativas para mostrar que os sujeitos com maior risco de câncer de bexiga são do sexo masculino (5,5 vezes mais risco de câncer de bexiga), com idade a partir de 65 anos (8,1 vezes mais risco) e fumantes (15,5 vezes mais risco).

Tabela 3 Análise de regressão logística multivariada para câncer de bexiga

Variáveis Selecionadas*	Categorias	Valor-P	OR**	IC 95% OR
Sexo	Feminino (ref.)	< 0,001	1,00	–
	Masculino		5,48	2,49 – 12,07
Idade	< 65 anos (ref.)	< 0,001	1,00	–
	≥ 65 anos		8,13	3,66 – 18,08
Tabagismo	Não (ref.)	< 0,001	1,00	–
	Sim		15,51	7,12 – 33,79

* Controle (n = 159); Câncer de bexiga (n = 94). Critério *Stepwise* de seleção de variáveis.

** OR = Razão de risco para câncer de bexiga; IC 95% OR = Intervalo de 95% de confiança para OR.

A maior parte dos casos, em concordância com os relatos da literatura, foi de tumores superficiais, o que ocorreu com 58 pacientes de nosso grupo, tratados de acordo com a normatização acima descrita. Trinta e seis eram tumores profundos, e também seguiram o protocolo padronizado já mencionado, sendo que 18 deles foram submetidos à cistectomia radical, três à cistectomia parcial e 15 foram submetidos somente à RTU + QTX e/ou RTX, por se tratarem de casos com metástases, por se recusarem à cirurgia radical ou ainda por falta de condições clínicas cirúrgicas.

Os pacientes foram assistidos por um período que variou de 12 a 64 meses com uma média de 19 meses.

Dos 58 tumores superficiais, 37 não recidivaram; 21 tiveram recidiva superficial, foram retratados e estão livres da doença até o momento; um paciente foi a óbito por outros motivos e outro foi submetido à cistectomia por múltiplas recidivas. Dos 36 profundos, oito foram a óbito pela doença; 15 estão vivos sem metástases e 13 estão vivos com metástases ou recidiva local. Dos 18 que fizeram cirurgia radical (grupo dos profundos), três foram a óbito pela doença; três apresentaram recidiva local e 12 estão livres da doença. Os três que fizeram cistectomia parcial estão livres de recidiva. Quatro fizeram RTX na bexiga ou nas metástases e 15 fizeram QTX adjuvante.

De acordo com os critérios de evolução/prognóstico mencionados na descrição da casuística, dentre os tumores superficiais, 27 foram bons e 31 ruins. Já nos profundos, 15 foram bons e 21 ruins (tabela 4).

Tabela 4 Classificação e prognóstico dos tumores vesicais

Classificação tumoral	Bom	Ruim
Superficial = 58	27	31
Profundo = 36	15	21

10.2 Resultados dos polimorfismos

A frequência dos genótipos nos pacientes e grupo controle estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os resultados dos polimorfismos no grupo dos tumores com os respectivos grupos controle estão demonstrados abaixo (tabela 5), assim como uma comparação dentro do grupo de tumores em relação à classificação e evolução (tabela 6).

Tabela 5 Resultados dos polimorfismos: controles x tumores

Gene	Polimorfismo	Controles		Câncer	
P53 códon 72	Arg / Arg selvagem	90 (56,60%)	159	64 (68,09%)	94
	Arg / Arg heterozigoto	60 (37,74%)		24 (25,53%)	
	Pro / Pro homozigoto	9 (5,66%)		6 (6,38%)	
P53 códon 47	Pro / Pro selvagem	159 (100%)	159	94 (100%)	94
	Pro / Ser heterozigoto	0		0	
	Ser / Ser homozigoto	0		0	

Tabela 6 Resultados dos polimorfismos quanto à classificação e prognóstico (superficial x profundo – $P = 0,634$)

Gene	Polimorfismo	Superficial			Profundo		
		Total = 58	Bom = 27	Ruim = 31	Total = 36	Bom = 15	Ruim = 21
P53 códon 72	Arg / Arg selvagem	38 (65,52%)	17 (62,96%)	21 (67,74%)	26 (72,2%)	11 (73,33%)	15 (71,42%)
	Arg / Arg heterozigoto	15 (25,86%)	7 (25,92%)	8 (25,80%)	9 (25%)	4 (26,66%)	5 (23,80%)
	Pro / Pro homozigoto	5 (8,62%)	3 (11,11%)	2 (6,45%)	1 (2,78%)	0	1 (4,76%)
P53 códon 47	Pro / Pro selvagem	58 (100%)	27 (100%)	31 (100%)	36 (100%)	15 (100%)	21 (100%)
	Pro / Ser heterozigoto	0	0	0	0	0	0
	Ser / Ser homozigoto	0	0	0	0	0	0

Quanto ao códon 47 de *P53*, observamos que todos os casos controle e todos os tumores foram normais (selvagem).

Em relação ao códon 72 de *P53*, não conseguimos demonstrar associação alguma entre a presença do polimorfismo (alelo prolina) e a incidência do tumor, ou a gravidade do mesmo, ou ainda o hábito de fumar, ou a marcação por sexo e raça. Contudo, o alelo Pro foi menos frequente na população de pacientes (6,38% em homozigoze e 25,53% em heterozigoze) do que nos controles (5,66% em homozigoze e 37,74% em heterozigoze), conferindo-lhes menor chance de câncer vesical, ou seja, representa um fator de proteção (tabela 7). Este dado, no entanto, desapareceu numa análise de regressão multivariada e univariada ajustada para sexo, idade e tabagismo, sugerindo que estava ligado a um destes fatores. Analisando a presença do polimorfismo quanto à idade, pudemos observar que, dentre os pacientes com tumor, aqueles com menos de 65 anos de idade, tiveram uma frequência maior do alelo polimórfico (prolina), 51,85%, comparado aos com mais de 65 anos, que tiveram uma frequência de 23,88% ($P = 0,009$ e $0,029$), como mostram as tabelas 8 e 9.

Tabela 7 Frequência dos genótipos do códon 72 de *P53* em 94 pacientes com tumor e 159 controles

Genótipo	Câncer n (%)	Controles n (%)	P	Odds Ratio (OR)	Intervalo de Confiança 95% OR
Arg / Arg	64 (68,09)	90 (56,60)	(*)		
Arg / Pro	24 (25,53)	60 (37,74)	0,049	0,56	0,32 a 0,99
Pro / Pro	6 (6,38)	9 (5,66)	0,907	0,94	0,32 a 2,77

A análise comparativa de regressão univariada considerou o tipo selvagem (Arg/Arg) como referência (*).
OR = Odds Ratio – Razão de risco para câncer de bexiga.

Tabela 8 Comparação dos polimorfismos 72 *P53* com idade ≥ 65

Teste qui-quadrado: $X^2 = 6,93$; GL = 1; $P = 0,009$
Poder da amostra: 74.12%.

Idade	<i>P53CO72</i>			
Frequency,				
Row Pct	Arg / Arg	Arg / Pro + Pro / Pro	Total	
<65	13 , 48,15 ,	14 , <u>51,85</u> ,	27 ,	
≥ 65	51 , <u>76,12</u> ,	16 , 23,88 ,	67 ,	
Total	64 ,	30 ,	94	

Tabela 9 Comparação dos polimorfismos 72 P53 com idade ≥ 65

Teste exato de Fisher: $P = 0,029$

Idade	P53CO72				
Frequency,					
Row Pct	, Arg / Arg	, Arg / Pro	, Pro / Pro		Total
<65	, 13 ,	, 11 ,	, 3 ,		27
	, 48,15 ,	<u>40,74</u> ,	<u>11,11</u> ,		
≥ 65	, 51 ,	, 13 ,	, 3 ,		67
	, <u>76,12</u> ,	19,40 ,	4,48 ,		
Total	64	24	6		94

DISCUSSÃO

Em relação ao códon 72 de *P53*, não encontramos qualquer associação com a incidência do tumor vesical ou seu prognóstico. A literatura pertinente é controversa. Chen et alii, em 2000, estudando 58 pacientes com câncer vesical em Taiwan, reportaram uma maior associação de prolina em pacientes com câncer invasivo (profundo), porém não detectaram associação entre a presença deste polimorfismo e a incidência de tumor (79). Também Mabrouk et alii, em 2003, relatam não detectar influência da mutação em 47 pacientes com câncer vesical na Tunísia (86). Já Kuroda et alii estudaram 112 pacientes com câncer urotelial no Japão, em 2002, e concluíram haver uma associação da mutação no códon 72, com uma maior incidência de câncer em tabagistas (80). Törüner et alii não puderam comprovar qualquer influência do polimorfismo em 121 pacientes com câncer vesical na Turquia (87). Outros dois estudos, no Japão (88) e em Taiwan (89), foram inconclusivos. Soultzis et alii, no entanto, encontraram uma chance maior de desenvolver câncer de bexiga em fenótipos Arg/Arg (81), investigando também o vírus HPV em câncer vesical, cuja oncoproteína parece diminuir a capacidade apoptótica de *P53* em câncer de colo uterino e genótipo Arg/Arg (90). Contudo, nenhum dos estudos acima citados avaliou a presença do polimorfismo em relação à idade dos pacientes. Nesse aspecto, um estudo conduzido por Murta-Nascimento et alii, na Espanha, demonstrou que alguns polimorfismos de enzimas de detoxificação têm uma maior associação com hereditariedade no câncer vesical, e a associação de hereditariedade foi maior em indivíduos que tiveram câncer com menos de 45 anos (45). Nossos achados em relação ao códon 72 de *P53* demonstram que, em indivíduos mais jovens, a herança deste polimorfismo poderia predispor ao aparecimento do câncer vesical. É possível que estes indivíduos sofram mais rapidamente o efeito de agentes carcinogênicos ambientais, que outros não portadores deste polimorfismo.

Quanto ao polimorfismo do códon 47 de *P53*, ele foi muito pouco estudado até o momento, e há apenas um relato na literatura que não conseguiu demonstrar associação do mesmo com a incidência de gliomas em 94 pacientes brasileiros (91). Acredita-se que alguns polimorfismos possam ser uma evolução genética com o intuito de proteger a espécie. O polimorfismo do códon 47 de *P53*, que foi descrito somente em indivíduos afro-americanos, talvez tenha surgido em populações mais próximas à linha do Equador, com a finalidade de diminuir a capacidade apoptótica

das células em resposta à radiação ultravioleta, induzindo-as a aumentar a pigmentação a fim de que estes indivíduos fixem menos vitamina D, cujo excesso poderia ser prejudicial (82). Nosso estudo sugere que este polimorfismo não possui maior relevância em nossa população.

Os dados que obtivemos, mostrando que sexo e tabagismo são fatores de risco para câncer vesical, foram condizentes com a literatura, porém com uma associação muito mais forte (sexo masculino 5,5 vezes e cigarro 15,5 vezes). Os resultados sugerem que, em nossa região, os homens estão muito mais expostos a fatores ambientais de risco e ao hábito de fumar do que as mulheres.

CONCLUSÃO

De acordo com o nosso objetivo, concluimos respectivamente:

1. Polimorfismos dos códons 47 e 72 do gene *P53* ocorrem em zero e em 31,91% dos pacientes portadores de câncer de bexiga. Em indivíduos abaixo de 65 anos de idade, com câncer vesical, o alelo prolina de 72*P53* foi mais frequente (51,85%) do que nos acima de 65 (23,88%).
2. O alelo prolina de 72*P53* foi menos frequente em pacientes do que nos controles.
3. Não houve associação entre a presença destes polimorfismos e a incidência da doença ou o prognóstico destes pacientes.
4. Não houve correlação entre a presença destes polimorfismos e outros fatores conhecidos de risco para câncer de bexiga, como raça, sexo e tabagismo.

Daí podemos constatar: o polimorfismo do códon 72 de *P53*, descrito em alguns estudos como um risco importante para o câncer vesical, talvez não seja um fator independente, mas sim associado à idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science*. 1987 Jan;235(4786):305-311.
2. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Nat Acad Sci. USA*. 1993 Dec; 90(23):10914-10921.
3. Messing EM. Urothelial Tumors of the Bladder. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*. 9th Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2007. 2407-46.
4. Miyamoto H, Yang Z, Chen YT, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, et alli. Promotion of bladder cancer development and progression by androgen receptor signals. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Apr;99(7):558-68.
5. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wings PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*. 2000 Jan-Feb;50(1):7-33.
6. Lynch CF, Cohen MB. Urinary system. *Cancer*. 1995 Jan;75(1 Suppl):316-29.
7. Canto MT, Chu KC. Annual cancer incidence rates for Hispanics in the United States. *Surveillance, Epidemiology, and End Results*, 1992 – 1996. *Cancer*. 2000 Jun;88(11):2642-52.
8. Feldman AR, Kessler L, Myers MH, Naughton MD. The prevalence of cancer: estimates based on the Connecticut Tumor Registry. *N Engl J Med*. 1986 Nov;315(22):1394-7.
9. Fleshner NE, Herr HW, Stewart AK, Murphy GP, Mettlin C, Menck HR. The National Cancer Data Base Report on Bladder Carcinoma. *Cancer*. 1996 Oct;78 (7):1505-13.
10. Linn JF, Sesterhann I, Mostofi FK, Schoenberg M. The molecular characteristics of bladder cancer in young patients. *J Urol*. 1998 May;159(5):1493-6.
11. Wan J, Grosman HB. Bladder carcinoma in patients age 40 years or younger. *Cancer*. 1989 Jul;64(1):178-81.
12. Morrison AS. Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am*. 1984 Nov;11(4):557-66.
13. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global Cancer Statistics*, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
14. Marshall VF. Current clinical problems regarding bladder tumors. *Cancer*. 1956 May-Jun;9(3):543-50.

15. Resseguie LJ, Nobrega FT, Farrow GM, Timmons JW, Worobec TG. Epidemiology of renal and ureteral cancer in Rochester, Minnesota, 1950 – 1974, with special reference to clinical and pathologic features. *Mayo Clin Proc.* 1978 Aug;53(8):503-10.
16. Kishi K, Hirota T, Matsumoto K, Kakizoe T, Murase T, Fujita J. Carcinoma of the bladder: a clinical and pathological analysis of 87 autopsy cases. *J Urol.* 1981 Jan;125(1):36-9.
17. Franks LM. Latent carcinoma of the prostate. *J Pathol Bacteriol.* 1954 Oct;68(2):603-16.
18. Hellsten S, Berge T, Wehlin L. Unrecognized renal cell carcinoma. Clinical and diagnostic aspects. *Scand J Urol Nephrol.* 1981;15(3):269-72.
19. Rehn L. Ueber blasentumoren bei fuchsinarbeitern. *Arch Kind Chir.* 1895;50:588.
20. Srougi M, Simon SD. Carcinoma Transicional de Bexiga. In: Srougi M, Simon SD. *Câncer Urológico.* São Paulo: Marprint Editora, Fotolito e Gráfica Ltda; 1996. p. 173-240.
21. Sarkis AS, Arap MA. Câncer Urológico. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular.* São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 213-218.
22. Morrison AS, Cole P. Epidemiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 1976 Feb;3(1):13-29.
23. Stadler WM. Molecular events in the initiation and progression of bladder cancer. *Int J Oncol.* 1993; 3:549-57.
24. Steineck G, Plato N, Norell SE, Hogstedt C. Urothelial cancer and some industry-related chemicals: an evaluation of the epidemiologic literature. *Am J Ind Med.* 1990; 17(3):371-91.
25. Liou SH, Lung JC, Chen YH, Yang T, HSieh LL, Chen CJ, Wu TN. Increased chromosome-type chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res.* 1999 Apr;59:1481-84.
26. Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman DA, Smith MT. Disease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997 Dec; 6(12):1051-6.
27. Chapman JW, Connolly JG, Rosenbaum L. Occupational bladder cancer: a case-control study. In Connolly JG (ed). *Carcinoma of the Bladder.* New York: Raven Press, 1981. p. 45.
28. Sontag JM. Experimental identification of genitourinary carcinogens. *Urol Clin North Am.* 1980 Oct;7(3):803-14.
29. Morrison AS. Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am.* 1984 Nov;11(4):557-66.

30. Renwick AG, Thakrar A, Lawrie CA, George CF. Microbial amino acid metabolites and bladder cancer: no evidence of promoting activity in man. *Hum Toxicol*. 1988 May;7(3):267-72.
31. Piper JM, Tonascia J, Matanoski GM. Heavy phenacetin use and bladder cancer in women aged 20 to 49 years. *N Engl J Med*. 1985 Aug;313(5):292-5.
32. Cohen SM, Garland EM, St John M, Okamura T, Smith RA. Acrolein initiates rat urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res*. 1992 Jul;52(13):3577-81.
33. Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, et alii. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med*. 2000 Jun;342(23):1686-92.
34. Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol*. 1984 Apr;119(4):510-5.
35. Locke JR, Hill DE, Walzer Y. Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. *J Urol*. 1985 Jun;133(6):1034-5.
36. Griffiths TR, Mellon JK. Human papillomavirus and urological tumours: I. Basic science and role in penile cancer. *BJU Int*. 1999 Sep;84(5):579-86.
37. Kaldor JM, Day NE, Kittelmann B, Pettersson F, Langmark F, Pedersen D, et alii. Bladder tumors following chemotherapy and radiotherapy for ovarian cancer: A case-control study. *Int J Cancer*. 1995 Sep;63(1):1-6.
38. Buzzeo BD, Heisey DM, Messing EM. Bladder cancer and renal transplant recipients. *Urology*. 1997 Oct;50(4):525-28.
39. Michaud DS, Spiegelman D, Clinton SK, Rimm EB, Curhan GC, Willett WC, Giovannucci EL. Fluid intake and the risk of bladder cancer in men. *N Engl J Med*. 1999 May;340(18):1390-7.
40. Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 1992 Aug;19(3):421-8.
41. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, et alii. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989 Oct;44 (4):622-8.
42. Augustine A, Hebert JR, Kabat GC, Wynder EL. Bladder cancer in relation to cigarette smoking. *Cancer Res*. 1988 Aug;48(15):4405-8.
43. Hoffman D, Masuda Y, Wynder EL. Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. *Nature*. 1969 Jan;221(5177):255-6.

44. Kiemeny LA, Moret NC, Witjes JA, Schoenberg MP, Tulinius H. Familial transitional cell carcinoma among the population of Iceland. *J Urol*. 1997 May;157(5):1649-51.
45. Murta-Nascimento C, Silverman DT, Kogevinas M, García-Closas M, Rothman N, Tardón A, et al. Risk of bladder cancer associated with family history of cancer: do low-penetrance polymorphisms account for the increase in risk?, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Aug;16(8):1595-600.
46. García-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: Results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses, *Lancet*. 2005 Aug;366 (9486):649-59.
47. Boulalas I, Zaravinos A, Karyotis I, Delakas D, Spandidos DA. Activation of RAS family genes in urothelial carcinoma. *J Urol*. 2009 May; 181(5):2312-9. Epub 2009 Mar 19.
48. Czerniak B, Cohen GL, Etkind P, Deitch D, Simmons H, Herz F, Koss LG. Concurrent mutations of coding and regulatory sequences of the Ha-ras gene in urinary bladder carcinomas. *Hum Pathol*. 1992 Nov;23(11):1199-204.
49. Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, et al. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res*. 1993 May;53(10):2199-203.
50. Brasil. Ministério da Saúde. TNM: Classificação de Tumores Malignos. 6.^a ed. Rio de Janeiro (RJ): INCA; 2004.
51. Pompeo ACL, Fonseca CEC, Wroclawski ER, Carrerette FB, Bretas FFH, Snitcovsky I, et al. Câncer da Bexiga. In: Koff WJ, Pompeo ACL, Damião R, Carrerette FB. *Diretrizes em Uro-oncologia*. Rio de Janeiro (RJ): Sociedade Brasileira de Urologia (SBU); 2005. p. 59-87.
52. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979 May;17(1):43-52.
53. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The P53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989 Jun;57(7):1083-93.
54. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type P53. *Science*. 1990 Aug;249(4971):912-5.
55. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sørli T, et al. Database of P53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*. 1994 Sep;22(17):3551-5.
56. DeWolf WC. P53: an important key to understanding urologic cancer. *AUA Update Series*; 1995;. 14:258.

57. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997 Feb;88(3):323-31.
58. Guidos CJ, Williams CJ, Grandal I, Knowles G, Huang MT, Danska JS. V(D)J recombination activates a P53-dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev*. 1996 Aug;10(16):2038-54.
59. Linke SP, Clarkin KC, DiLeonardo A, Tsou A, Wahl GM. A reversible, P53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev*. 1996 Apr;10 (8):934-47.
60. Gottlieb TM, Oren M. P53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun;1287(2-3):77-102.
61. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 1993 Apr;362(6423):847-9.
62. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, et alli. P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002 Jan;415(6867):45-53.
63. Bouck N. P53 and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1996 May;1287(1):63-6.
64. Gottlieb TM, Oren M. P53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jun;1287(2-3):77-102.
65. Maheswaran S, Englert C, Bennett P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes P53 and inhibits P53-mediated apoptosis. *Genes Dev*. 1995 Sep;9(17):2143-56.
66. Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The P53 Tumor Suppressor Gene and Nuclear Protein: Basic Science Review and Relevance in the Management of Bladder Cancer. *J Urol*. 2003 Apr;169(4):1219-28.
67. Vet JA, Witjes JA, Marras SA, Hessels D, Van der Poel HG, Debruyne FM, et alii. Predictive value of P53 mutations analyzed in bladder washings for progression of high-risk superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 1996 Jun;2(6):1055-61.
68. Zlotta AR, Noel JC, Fayt I, Drowart A, Van Vooren JP, Huygen K, et alli. Correlation and prognostic significance of p53, p21WAF1/CIP1 and Ki-67 expression in patients with superficial bladder tumors treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy. *J Urol*. 1999 Mar;161(3):792-8.
69. Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Sheinfeld J, Fair WR, et alli. Nuclear overexpression of P53 protein in transitional cell bladder carcinoma: a marker for disease progression. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Jan;85(1):53-9.

70. Parmigiani RB, Camargo AA. O Genoma Humano e o Câncer. In: Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004. p. 3-11
71. Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human P53. *Mol Cell Biol*. 1987 Feb;7(2):961-3.
72. Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the P53 gene. *Nucleic Acids Res*. 1990 Aug;18(16):4961.
73. Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered*. 1994 Sep-Oct;44(5):266-70.
74. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of P53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):357-65. Epub 2003 Feb 3.
75. Wang YC, Chen CY, Chen SK, Chang YY, Lin P. P53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin Cancer Res*. 1999 Jan;5(1):129-34.
76. Boltze C, Roessner A, Landt O, Szibor R, Peters B, Schneider-Stock R. Homozygous proline at codon 72 of P53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2002 Nov;21(5):1151-4.
77. Granja F, Morari EC, Morari J, Correia LAC, Assumpcao LVM, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of P53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett*. 2004 Jul;210(2):151-7.
78. Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, Leite JL, Granja F, Ward LS. Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Aug;132(8):521-8. Epub 2006 May 19.
79. Chen WC, Tsai FJ, Wu HC, Lu HF, Li CW. Distribution of P53 codon 72 polymorphism in bladder cancer-proline form is prominent in invasive tumor. *Urol. Res*. 2000 Oct;28(5):293-6.
80. Kuroda Y, Tsukino H, Nakao H, Imai H, Kath T. P53 codon 72 polymorphism and urothelial cancer risk. *Cancer Lett*. 2003 Jan;189(1):77-83.
81. Soultzis N, Sourvinos G, Dokianakis DN, Spandidos DA. P53 codon 72 polymorphism and its association with bladder cancer. *Cancer Lett*. 2002 May;179(2):175-83.
82. Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in P53 is functionally significant. *J Biol Chem*. 2005 Jun;280(25):24245-51.

83. Gerwin BI, Spillare E, Forrester K, Lehman TA, Kispert J, Welsh JA, et alii. Mutant P53 can induce tumorigenic conversion of human bronchial epithelial cells and reduce their responsiveness to a negative growth factor, transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Apr;89(7):2759-63.
84. Granja F, Morari EC, Morari J, Correia LAC, Assumpcao LVM, Ward LS. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Lett*. 2004 Jun;209(2):129-37.
85. Aral C, Caglayan S, Massoumily S, Sonmez O, Ozisik G, Akkiprik M, et alii. Association of P53 codon 72 polymorphism with thyroid cancer in Turkish patients. *Balkan Journal of Medical Genetics*. 2006; 9(3-4):51.
86. Mabrouk I, Baccouche S, El-Abed R, Mokdad-Gargouri R, Mosbah A, Saïd S, et alii. No evidence of correlation between p53 codon 72 polymorphism and risk of bladder or breast carcinoma in Tunisian patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1010:764-70.
87. Törüner GA, Uçar A, Tez M, Cetinkaya M, Ozen H, Özçelik T. P53 codon 72 polymorphism in bladder cancer--no evidence of association with increased risk or invasiveness. *Urol Res*. 2001 Dec;29(6):393-5.
88. Wu WJ, Kakehi Y, Habuchi T, Kinoshita H, Ogawa O, Terachi T, et alii. Allelic frequency of p53 gene codon 72 polymorphism in urologic cancers. *Jpn J Cancer Res*. 1995 Aug;86(8):730-6.
89. Chung CJ, Huang CJ, Pu YS, Su CT, Huang YK, Chen YT, Hsueh YM. Polymorphisms in cell cycle regulatory genes, urinary arsenic profile and urothelial carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Oct15;232(2):203-9. Epub 2008 Jul 1.
90. Storey M, Thomas A, Kalita C, Harwood D, Gardiol F, Mantovani J, et alii. Role of a P53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998 May;393(6682):229-34.
91. Pinto GR, Yoshioka FK, Silva RL, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, et alii. Prognostic value of TP53 Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genet Mol Res*. 2008 Feb; 7(1):207-16.

14
ANEXO

14.1 Termo de consentimento



LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas
Departamento de Clínica Médica

Termo de Consentimento

Projeto de Pesquisa: *Tumores de Bexiga Urinária*

Orientadora: Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Aluno: Luís Eduardo Murgel de Castro Santos

Paciente ou Responsável:

Sr(a)	
Idade	RG
Endereço	
Telefone	

Concordo em doar sangue para pesquisa de genes (contidos no DNA) que podem estar envolvidos nas NEOPLASIAS VESICAIS. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo que os dados de meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam usados para avaliar a importância dos genes, sabendo que meu nome, assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação. Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou ao tratamento dos cânceres de

bexiga, mesmo que eu não me beneficie disto agora. Não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual.

Estou consciente da importância da minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e sei que poderei obter todas as informações que desejar e necessitar no fone: 19 3788.8936.

Contatos:

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Coordenadora do Gemoca • Medicina interna CI Med./ FCM • Unicamp
Cidade Universitária • CEP 13081-970 • Campinas • São Paulo
Fone 19 3788.8954

Luís Eduardo Murgel de Castro Santos

Aluno da Pós-Graduação da Clínica Médica • FCM • Unicamp
Cidade Universitária • CEP 13081-970 • Campinas • São Paulo
Fone 19 3788.8954

Assinatura do paciente
ou responsável