



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIA AYUMI IKEDA KAWASAKI

**PERFIL DE IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2 E γ -
H2AX EM AMOSTRAS TECIDUAIS MALIGNAS DE BEXIGA E
CORRELAÇÃO COM INVASÃO À CAMADA MUSCULAR E
RECIDIVA TUMORAL**

Londrina
2024



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



IDR-Paraná

Instituto de Desenvolvimento
Rural do Paraná - IAPAR-EMATER



JULIA AYUMI IKEDA KAWASAKI

**PERFIL DE IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2 E γ -
H2AX EM AMOSTRAS TECIDUAIS MALIGNAS DE BEXIGA E
CORRELAÇÃO COM INVASÃO À CAMADA MUSCULAR E
RECIDIVA TUMORAL**

JULIA AYUMI IKEDA KAWASAKI

**PERFIL DE IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2
E γ -H2AX EM AMOSTRAS TECIDUAIS MALIGNAS DE
BEXIGA E CORRELAÇÃO COM INVASÃO À CAMADA
MUSCULAR E RECIDIVA TUMORAL**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Roberta Losi Guembarovski
Coorientador: Juliana Mara Serpeloni

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

K22p Kawasaki, Julia Ayumi Ikeda.
Perfil de imunomarcção das proteínas BCL-2 e γ -H2AX em amostras teciduais malignas de bexiga e correlação com invasão à camada muscular e recidiva tumoral / Julia Ayumi Ikeda Kawasaki. - Londrina, 2024.
90 f. : il.

Orientador: Roberta Losi Guembarovski.
Coorientador: Juliana Mara Serpeloni.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Carcinoma urotelial de bexiga - Tese. 2. Imunohistoquímica - Tese. 3. Marcadores prognósticos - Tese. I. Guembarovski, Roberta Losi . II. Serpeloni, Juliana Mara . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 574

JULIA AYUMI IKEDA KAWASAKI

**PERFIL DE IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2
E γ -H2AX EM AMOSTRAS TECIDUAIS MALIGNAS DE
BEXIGA E CORRELAÇÃO COM INVASÃO À CAMADA
MUSCULAR E RECIDIVA TUMORAL**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Roberta Losi
Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Bruna Karina Banin Hirata
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 01 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa permanência, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pesquisa do Sistema Único de Saúde (PPSUS) pelo financiamento da pesquisa realizada. Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Roberta Losi Guembarovski e a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Juliana Mara Serpeloni por todo apoio, auxílio e ensinamentos ao longo do desenvolvimento do projeto proposto.

Deixo ainda o meu muito obrigada à equipe do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) por ter compartilhado conhecimentos, bons momentos e muito trabalho.

À médica patologista Dr^a Alda F. M. L. Guembarovski e ao Dr. Diego Luís Ribeiro, agradeço respectivamente pelas análises histopatológica e semiquantitativa da imunohistoquímica e contribuições com o artigo confeccionado a partir deste projeto.

À banca de defesa, Prof^a. Dr^a. Bruna Karina Banin Hirata e Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron, agradeço o aceite e contribuições com esta dissertação.

Aos amigos que me acolheram, agradeço a companhia e os bons momentos. Vocês são como eu sempre digo: “os melhores amigos que alguém poderia querer e ter”.

Sou grata pelos inúmeros ensinamentos e suporte que minha família ofereceu, principalmente ao falecido tio Jarbas Kiyoshi Alves Kawasaki, você sempre foi e será luz na minha vida. Ao seu companheiro Paulo Henrique Braga, que persiste neste papel de pai/mãe, obrigada por continuar ao meu lado. Ao meu irmão Luís Felipe Kawasaki, obrigada por me apoiar mesmo que de longe.

Por fim, agradeço a minha família de fé, em especial ao pai de santo Muka d'Oyá e aos padrinhos Pedro de Xangô e João de Yemanjá por serem meus alicerces. A minha gratidão pela Casa Ventos de Mãe Oyá e por esta segunda família será eterna, axé para quem for de axé

*“...Você verá que é mesmo assim
Que a história não tem fim
Continua sempre que você
Responde sim à sua imaginação
A arte de sorrir
Cada vez que o mundo diz não...”*

Brincar de Viver – Maria Bethânia

KAWASAKI, Julia Ayumi Ikeda. **Perfil de imunomarcção das proteínas BCL-2 e γ -H2AX em amostras teciduais malignas de bexiga e correlação com invasão à camada muscular e recidiva tumoral**, 2024 90 p. Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, 2024.

RESUMO

O carcinoma urotelial de bexiga (CUB) é uma neoplasia maligna do trato urinário de alta prevalência no mundo e que apresenta elevada taxa de recidiva tumoral, acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino. No entanto, esta doença carece de marcadores capazes de predizer recidiva e agressividade tumoral. Sabe-se que o gene *BCL2 apoptosis regulator (BCL-2)* codifica uma proteína que atua na regulação da morte celular programada, processo alterado no desenvolvimento de tumores malignos. Já o gene *H2A variant histone (H2AX)* codifica uma histona responsável pela sinalização de danos à dupla fita do DNA, que contribui no recrutamento de fatores de reparo e pode influenciar ainda na formação de neoplasias malignas. Dentro deste contexto, objetivou-se realizar a análise do perfil de imunomarcção destas duas proteínas em 80 amostras teciduais de pacientes portadores de CUB (19 invasivos e 61 não invasivos ao músculo) e relacioná-los com parâmetros prognósticos (tempo da primeira recidiva, imunohistoquímica de p53, estadiamento, grau tumoral), clínicos (diabetes, hipertensão, medicamento de uso contínuo, histórico familiar de câncer) e de exposição ambiental (exposição ocupacional, hábitos tabagista e etilista), além de idade e sexo. As amostras “não invasivas” foram subdivididas em subgrupos: sem recidiva (n=24), com uma recidiva (n=18) e com mais de uma recidiva (n=19). A análise da expressão das proteínas BCL-2 e γ -H2AX foi realizada por meio da técnica de imunohistoquímica (IHQ) indireta, considerando-se marcação fraca e forte. A análise estatística foi realizada por meio dos testes do Qui-quadrado e Tau-b de Kendall (*IBM® SPSS® Statistics for Windows*, versão 23.0.1). O conjunto amostral foi composto principalmente por homens (73,8%) e indivíduos não fumantes (65,0%), com média de idade de $69,43 \pm 10,99$ anos. Tecidos não tumorais adjacentes foram avaliados como padrão de comparação, onde observou-se imunomarcção fraca para BCL-2 e ausente para γ -H2AX, na maioria das amostras. Em relação ao tecido tumoral maligno, foi possível observar que a marcação de BCL-2 ocorreu no citoplasma e foi ausente em metade das amostras (n=40), apresentando uma maior frequência no grupo amostral invasivo (52,26%). Em relação a imunomarcção da γ -H2AX, foi observada expressão exclusivamente nuclear e predominantemente forte (+++) nas amostras invasivas (52,6%). Não foram constatadas associações significativas entre a imunomarcção no tecido tumoral em relação aos parâmetros prognósticos, socioculturais, clínicos ou exposição ambiental. Adicionalmente, não foram identificadas correlações significativas considerando-se as marcações de BCL-2 e γ -H2AX entre si ($p=0,158$). Conclui-se, com base no presente estudo, que as proteínas BCL-2 e γ -H2AX emergem como candidatas a biomarcadores para o CUB por sua expressão no tecido tumoral, mas que nas amostras do presente estudo não se mostraram

associadas ao prognóstico da doença, em especial à invasão da camada muscular ou a presença de recidiva tumoral.

Palavras-chave: Carcinoma urotelial de bexiga; prognóstico; reincidência tumoral; imunohistoquímica

KAWASAKI, Julia Ayumi Ikeda. **Immunostaining profile of proteins BCL-2 and γ -H2AX in malignant bladder tissue samples and their correlation with invasion of the muscular layer and tumor recurrence**, 2024 86 p. Defense presented to the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, at the State University of Londrina, as a requirement for the Master's degree, 2024.

ABSTRACT

The urothelial bladder carcinoma (UBC) is a highly prevalent malignant neoplasm of the urinary tract worldwide, and exhibits a high rate of tumor recurrence, mainly in men. However, this disease lacks markers capable of predicting recurrence and tumor aggressiveness. It is known that the *BCL2 apoptosis regulator (BCL-2)* gene encodes a protein that plays a role in the regulation of programmed cell death, a process altered in the development of malignant tumors. Meanwhile the *H2A variant histone (H2AX)* gene encodes the histone responsible for the signaling double strand breaks, which contributes to the recruitment of repair factors and can also influence the formations of malignant neoplasm. In the context, the objective was to perform the analysis of the immunostaining profile of these both proteins in 80 tissue samples from patients with UBC (19 invasive and 61 non-invasive to muscle) and correlate them with prognosis parameters (tumor recurrence time, immunohistochemistry of p53, staging and tumor grade), clinical factors (diabetes, hypertension, family history of cancer, medication for continuous use) and environmental exposure (occupational exposure, smoking and alcohol consumption habits), beyond age and sex. The “non-invasive” samples were subdivided into subgroups: without recurrence (n=24), with one recurrence (n=18) and with more than one recurrence (n=19). The evaluation of BCL-2 and γ -H2AX protein expression was performed using the indirect immunohistochemistry (IHC) technique, considering weak and strong staining. The statistical analysis was conducted using the Chi-squared and Kendall’s Tau tests (IBM® SPSS® Statistics for Windows, version 23.0.1). The sample set consisted primarily of men (73.8%), and non-smoking (65.0%), with an average age of 69.43 ± 10.99 years. Adjacent non-tumors tissues samples were assessed as a standard comparison, with weak immunostaining for BCL-2 and absence of staining for γ -H2AX observed for the majority of samples. In relation to malignant tumor tissue it was observed that BCL-2 staining occurred in the cytoplasm and was absent in half of the samples (n=40), with higher frequency in the invasive sample group (52.6%). Regarding the γ -H2AX immunostaining, exclusively nuclear expression was observed, predominantly strong, especially in invasive samples (52.6%). No significant association was found between immunostaining in malignant tumor tissue and prognostic, sociocultural, clinical or environmental exposure parameters. Additionally, non-significant correlations were identified when considering the staining of BCL-2 and γ -H2AX together (p=0.158). Based on the present study, it is concluded that BCL-2 and γ -H2AX proteins emerge as candidates for UBC biomarkers due to their expression in the tumor tissue. However, in the samples of the present study, they did not appear to be associated with the disease prognosis, especially with muscle layer invasion or tumor recurrence.

Key-words: urothelial bladder cancer; prognosis; tumor recurrence; immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

DISSERTAÇÃO

- Figura 1** - Fotomicroscopia de luz de corte histológico de tumor maligno da bexiga corado por hematoxilina e eosina, focado no tecido não tumoral adjacente..... 19
- Figura 2** - Mapa mundial de distribuição de pacientes do sexo masculino portadores de tumores malignos de bexiga 20
- Figura 3** - Mapa mundial de distribuição de pacientes do sexo feminino portadores de tumores malignos de bexiga 21
- Figura 4** - Descrição da quantidade e porcentagem referentes aos 10 cânceres mais comuns entre indivíduos brasileiros do sexo masculino 22
- Figura 5** - Esquema demonstrando as diferenças entre tecido não tumoral adjacente, tumor de bexiga invasivo ao músculo e não invasivo à musculatura por coloração com hematoxilina-eosina 23
- Figura 6** - Esquematisação dos estádios Tis, Ta, T1, T2, T3 e T4 referentes ao CUB, segundo a classificação TNM 24
- Figura 7** - Mecanismo de inibição da via apoptótica intrínseca pela proteína BCL-2..... 30
- Figura 8** - Sinalização de dano de dupla fita de DNA pela histona modificada γ -H2AX..... 33
- Figura 9** - Divisão da amostra total nos grupos "invasivo" e "não invasivo". Composição dos subgrupos amostrais: "não invasivo sem recidiva", "não invasivo com uma recidiva", "não invasivo com mais de uma recidiva. 37

CAPÍTULO I

- Figura 1** - Divisão da amostra total de pacientes de CUB nos grupos "invasivo" e "não invasivo". Composição dos subgrupos amostrais: "não invasivo sem recidiva", "não invasivo com uma recidiva", "não invasivo com mais de uma recidiva".....44

Figura 2 -	Imunomarcção positiva para a proteína BCL-2 em infiltrado linfocitário de amostra tecidual de paciente portador de CUB	46
Figura 3 -	Perfil de imunomarcção da proteína BCL-2 em amostras teciduais de pacientes portadores de CUB	49
Figura 4 -	Perfil de imunomarcção da proteína γ -H2AX em amostras teciduais de pacientes portadores de CUB	50

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

Tabela 1 - Resumo das descrições dos estadiamentos tumorais: características do tumor, dos linfonodos regionais e metástases (classificação TNM)	26
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Caracterização da amostra total em relação aos parâmetros socioculturais e de exposição ambiental e associação com invasão muscular.....	48
Tabela 2 - Análises de associação e correlação do perfil de imunomarcção da proteína BCL-2 em relação aos parâmetros socioculturais, de exposição e prognósticos em pacientes portadores de CUB	52
Tabela 3 - Análises de associação e correlação do perfil de imunomarcção da proteína γ -H2AX em relação aos parâmetros socioculturais, de exposição e prognósticos em pacientes portadores de CUB	54

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1 - Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “invasivo”	64
Tabela 2 - Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “não invasivo sem recidiva”	65
Tabela 3 - Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “não invasivo com uma recidiva”	66
Tabela 4 - Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “não invasivo com mais de uma recidiva”	67

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

- Gráfico 1** - Número de pacientes portadores dos perfis ausente, fraco e forte de imunomarcacão para as proteínas BCL-2 e γ -H2AX na amostra total e nos grupos “nãoinvasivo” e “invasivo” 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-NA	Ácido 2-nitrobenzóico
ADBAQ	1-amino-2,4-dibromoanthraquinone
AUDA	Ácido 11-aminoundecanóico
BAK	Antagonista de morte BCL-2 (do inglês, <i>BCL2 antagonist-killer</i>)
BAX	Regulador de apoptose X associado a BCL2 (do inglês, <i>BCL2 associated X apoptosis regulator</i>)
BBN	Beta-benzilaminonorepinefrina
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCL-2	Regulador de apoptose BCL-2 (do inglês, <i>BCL2 Apoptosis Regulator</i>)
CK20	Citoqueratina 20 (do inglês, <i>Citokeratine 20</i>)
CUB	Carcinoma urotelial de bexiga
GATA3	Proteína de ligação GATA 3 (do inglês, <i>GATA Binding Protein 3</i>)
GLOBOCAN	Observatório Global de Câncer (do inglês, <i>The Global Cancer Observatory</i>)
H2AX	Variante de histona H2A (do inglês, <i>H2A Variant Histone</i>)
γ-H2AX	Variante de histona H2A fosforilada (do inglês, <i>fosfo H2A Variant Histone</i>)
HCL	Hospital de Câncer de Londrina
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAMON	Laboratório de Mutagênese e Oncogenética
NDPA	N-nitrosodifenilamina
PBS	Tampão salino-fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PEITC	Fenetil Isotiocinato
PNC	Fenacetina
RTU	Ressecção transuretral
SOPP	o-fenilfenato de sódio
TCGA	Atlas do Genoma do Câncer (do inglês, <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase (do inglês, <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase

UBC

Carcinoma urotelial de bexiga (do inglês. *Urothelial Bladder Carcinoma*)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Anatomia e histologia da bexiga urinária	18
2.2	Carcinoma urotelial de bexiga	19
2.2.1	Definição e epidemiologia	19
2.2.2	Classificação, prognóstico e tratamento.....	22
2.2.3	Fatores de risco	27
2.3	Proteínas candidatas	28
2.3.1	BCL-2.....	28
2.3.2	γ -H2AX.....	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivos gerais	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	Seleção da amostra	36
4.2	Cortes das amostras de tumor de bexiga incluídas em parafina	37
4.3.	Imunohistoquímica indireta	38
4.4	Análise estatística	39
5	CAPÍTULO I	40
6	CONCLUSÕES FINAIS	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9	ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

2 *The Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) realizou em 2024 um
3 levantamento da incidência do carcinoma urotelial de bexiga (CUB), sendo este
4 classificado como o nono tipo de câncer mais comum no mundo e o décimo
5 terceiro com maior mortalidade no mesmo ano. Além disso, estima um aumento
6 de 6,8% dos casos de CUB até 2025 (GLOBOCAN, 2022). O Instituto Nacional
7 do Câncer (INCA) estimou que até 2025 haverá 11370 casos novos para os anos
8 2023 e 2024 de CUB no Brasil, sendo 650 somente no estado do Paraná (INCA,
9 2022).

10 O CUB apresenta como principal sintoma a hematúria indolor, presença
11 de sangue na urina, seja ela macroscópica ou microscópica (KHADRA et al.
12 2000). Desta forma, quando identificada, o primeiro exame a ser realizado
13 mediante esta suspeita é a cistoscopia. Caso o resultado seja indicativo de CUB,
14 é realizada uma ressecção transuretral deste tumor, através da qual é possível
15 averiguar o estadiamento e a invasividade tumoral (NICE GUIDANCE, 2017).
16 Além destes, podem ser realizados a análise citológica da urina e exames de
17 imagens que irão identificar respectivamente, alterações nas células do trato
18 urinário e massas teciduais plausíveis de serem malignas ou benignas
19 (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2021).

20 A proteína *GATA binding protein 3* (GATA3) é considerada um
21 biomarcador de tumor de bexiga invasivo ao músculo, e sua elevada expressão
22 indica aumento de sobrevida e diminuição de risco de recidiva (WANG et al.
23 2019). Outra proteína também consolidada como biomarcador desta neoplasia
24 maligna é a citoqueratina 20 (CK20), a qual é recorrente em casos de tumores
25 papilíferos de bexiga não invasivos de baixo grau, entretanto não há uma relação
26 com a recidiva (ALSHEIKH et al. 2001).

27 Ao relacionar a imunomarcção de proteínas como a GATA3, pode-se
28 iniciar o tratamento precoce e mais adequado ao estadiamento e invasividade
29 do tumor, cessando ou diminuindo a possibilidade de uma recidiva e, por
30 conseguinte, elevando a taxa de sobrevida do indivíduo.

31 Dentro deste contexto, as proteínas *BCL2 apoptosis regulator* (BCL-2) e
32 *H2A variant histone* (H2AX) responsáveis, respectivamente, por inibir a morte
33 celular por apoptose (KERR et al. 1972) e sinalizar danos de dupla fita de DNA
34 (ROGAKOU et al. 1998), estão associadas a características importantes para o

1 processo de carcinogênese, como imortalidade replicativa e instabilidade
2 genômica (HANAHAN, 2022). Dadas as características destas moléculas, bem
3 como a alta prevalência dos tumores de bexiga no Brasil e no mundo, em ambos
4 os sexos, e sua alta taxa de recidiva com intensa comorbidade aos pacientes, a
5 investigação de proteínas candidatas na busca por novos marcadores de
6 prognóstico possui uma grande relevância científica e foi objeto de investigação
7 do presente estudo.

8

9 **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

10 **2.1 ANATOMIA E HISTOLOGIA DA BEXIGA URINÁRIA**

11 A bexiga urinária é um órgão elástico que se localiza posteriormente à
12 sínfise púbica e tem como função armazenar a urina (DANGELO & FATTINI,
13 2011). Composta principalmente por músculo detrusor que impede o refluxo
14 urinário, é dividida em três regiões: fundo da bexiga, corpo da bexiga e colo da
15 bexiga (MOORE et al. 2019).

16 Composta por uma camada de epitélio de transição, que fica em contato
17 com o lúmen, uma extensa área de feixes musculares e por tecido conjuntivo
18 frouxo e denso, neste está contida a lâmina própria (JUNQUEIRA & CARNEIRO,
19 2017). (Figura 1).

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

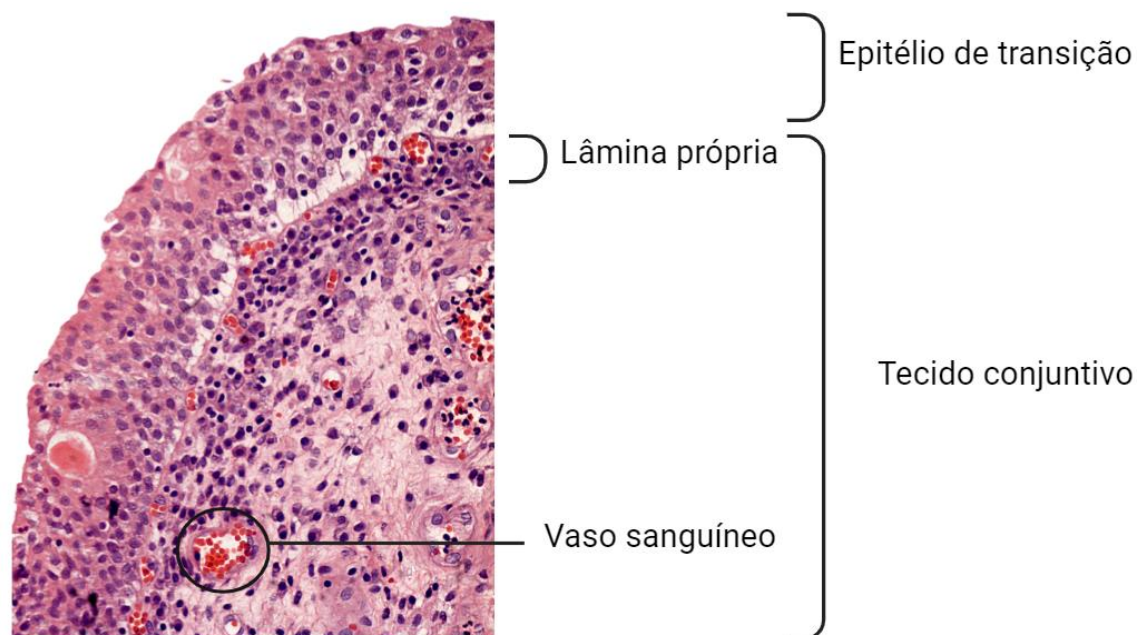
31

32

33

34

1 **Figura 1.** Fotomicroscopia de luz de corte histológico de tumor maligno da bexiga corado por
 2 hematoxilina e eosina, focado no tecido não tumoral adjacente.



3
 4 Nesta imagem é possível identificar o epitélio de transição e o tecido conjuntivo em amostra não
 5 tumoral adjacente da bexiga. No tecido conjuntivo destaca-se a lâmina própria importante para
 6 o estadiamento patológico do CUB. Aumento de 20x em microscópio em microscópio Leica, DM
 7 2000. Criado no Biorender. **Fonte:** Próprio autor

8

9 2.2 CARCINOMA UROTELIAL DE BEXIGA

10 2.2.1 Definição e epidemiologia

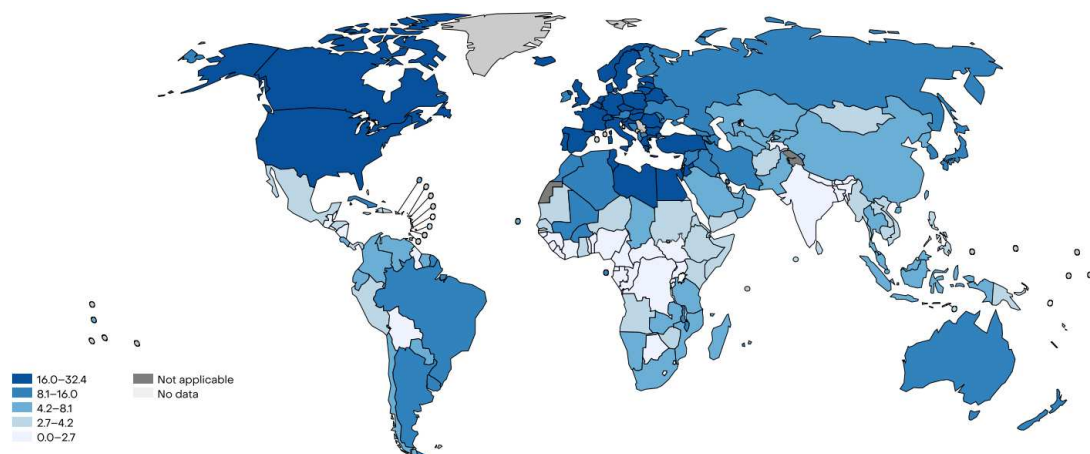
11 O CUB consiste em um conjunto de enfermidades nas quais as células da
 12 bexiga urinária apresentam o ciclo celular alterado, e se proliferam de forma
 13 exacerbada e descontrolada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Como
 14 mutações ou silenciamento do *gene telomerase reverse transcriptase (TERT)*
 15 podem ser citadas (RACHAKONDA et al. 2013), já que este transcrito de
 16 proteína homônima é responsável por alongar os telômeros, impedindo o
 17 envelhecimento celular e permitindo que a célula continue se dividindo
 18 (BLACKBURN, 1998).

19 O carcinoma de células transicionais é o principal tipo de neoplasia de
 20 bexiga urinária. Em menos de 1% dos casos, os tumores de tal órgão são
 21 classificados como carcinomas de células pequenas, carcinomas
 22 espinocelulares e adenocarcinomas, sendo estes dois últimos quase sempre
 23 invasivos ao músculo (INSTITUTO ONCOGUIA, 2020).

1 Saginala et al, 2020, por meio da análise dos dados de epidemiologia do
2 CUB armazenados na plataforma GLOBOCAN, averiguaram que este consiste
3 no décimo tipo de neoplasia maligna mais comum mundialmente (Figuras 2 e 3),
4 e que seus índices em homens e mulheres equivalem respectivamente a
5 9.6/100000 e 2.4/100000. Esta discrepância ainda não foi completamente
6 elucidada pela literatura, sendo parcialmente explicada pela prevalência do
7 hábito tabagista em homens, fator de risco mais relevante para o
8 desenvolvimento da doença (FREEDMAN et al. 2011).

9

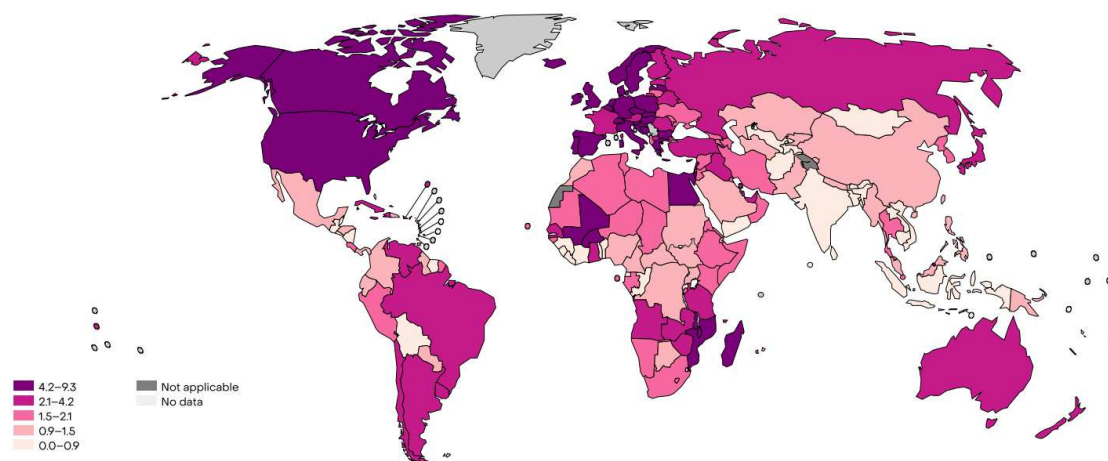
10 **Figura 2.** Mapa mundial de distribuição de pacientes do sexo masculino portadores de tumores
11 malignos de bexiga.



As cores mais escuras marcam os locais com maiores concentrações de indivíduos afetados.

Fonte: GLOBOCAN (2024)

1 **Figura 3.** Mapa mundial de distribuição de pacientes do sexo feminino portadores de tumores
2 malignos de bexiga.



As cores mais escuras são indicadoras de maiores concentrações de indivíduos afetados.

Fonte: GLOBOCAN (2024)

Em relação às estimativas de 2020 para a população brasileira, estimou-se 11370 casos de neoplasia de bexiga urinária, sendo 7870 em homens e 3500 em mulheres, consistindo no sétimo câncer mais comum (Figura 4) em indivíduos brasileiros do sexo masculino com exceção do câncer de pele não melanoma (Instituto Nacional de Câncer, 2022). Entretanto, ele é frequentemente diagnosticado como não invasivo ao músculo em homens, enquanto as mulheres são acometidas, em sua maioria, pelo subtipo invasivo (FAJKOVIC et al. 2011), além de apresentarem maior índice de metástase (RADKIEWICZ et al. 2020).

1 **Figura 4.** Descrição da quantidade e porcentagem referentes aos 10 cânceres mais comuns
 2 entre indivíduos brasileiros do sexo masculino.

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	71.730	30,0
Cólon e Reto	21.970	9,2
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.020	7,5
Estômago	13.340	5,6
Cavidade Oral	10.900	4,6
Esôfago	8.200	3,4
Bexiga	7.870	3,3
Laringe	6.570	2,7
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7
Fígado	6.390	2,7
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	239.430	100,0
Todas as Neoplasias	341.350	

3

4 O CUB consiste na sétima neoplasia mais comum entre os homens brasileiros. **Fonte:** Instituto
 5 Nacional de Câncer (2022).

6

7 2.2.2 Classificação, prognóstico e tratamento

8 Os tumores de bexiga são divididos em dois grupos: não invasivo ao
 9 músculo e invasivos ao músculo (Anexo I; Figura 5), sendo que o primeiro possui
 10 células tumorais restritas à mucosa, enquanto no segundo tais células invadem
 11 as camadas musculares mais profundas da parede da bexiga urinária e podem
 12 levar à ocorrência das lesões metastáticas (FLAIG et al. 2020)

13

14

15

16

17

18

19

20

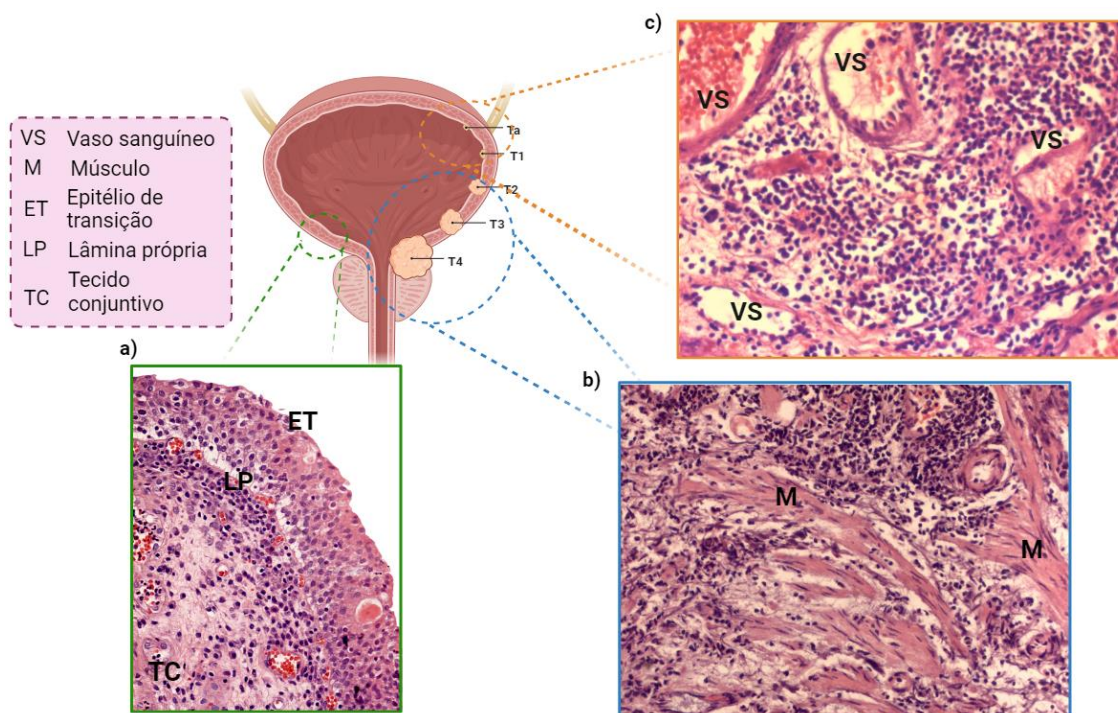
21

22

23

24

1 **Figura 5.** Esquema demonstrando as diferenças entre tecido não tumoral adjacente, tumor de
 2 bexiga invasivo ao músculo e não invasivo à musculatura por coloração com hematoxilina-
 3 eosina.



4
 5 O CUB é classificado de acordo com a invasão à camada muscular adjacente, sendo estes tipos
 6 de tumores denominados CUB não invasivo ao músculo e CUB invasivo ao músculo. a) foto de
 7 corte histológico de tumor de bexiga corado por hematoxilina-eosina, evidenciando a região não
 8 tumoral adjacente, em que é possível observar o epitélio de transição, lâmina própria e tecido
 9 conjuntivo de maneira estratificada, entretanto este tecido possui características únicas. b) foto
 10 de corte histológico de tumor invasivo ao músculo corado por hematoxilina-eosina, na qual é
 11 possível identificar algumas células musculares rodeadas por células tumorais. c) foto de corte
 12 histológico de tumor não invasivo ao músculo corado por hematoxilina-eosina, em que é possível
 13 observar apenas células tumorais e vasos sanguíneos. Aumento de 10x em microscópio em
 14 microscópio Leica, DM 2000. Criado no Biorender. **Fonte:** Próprio autor

15

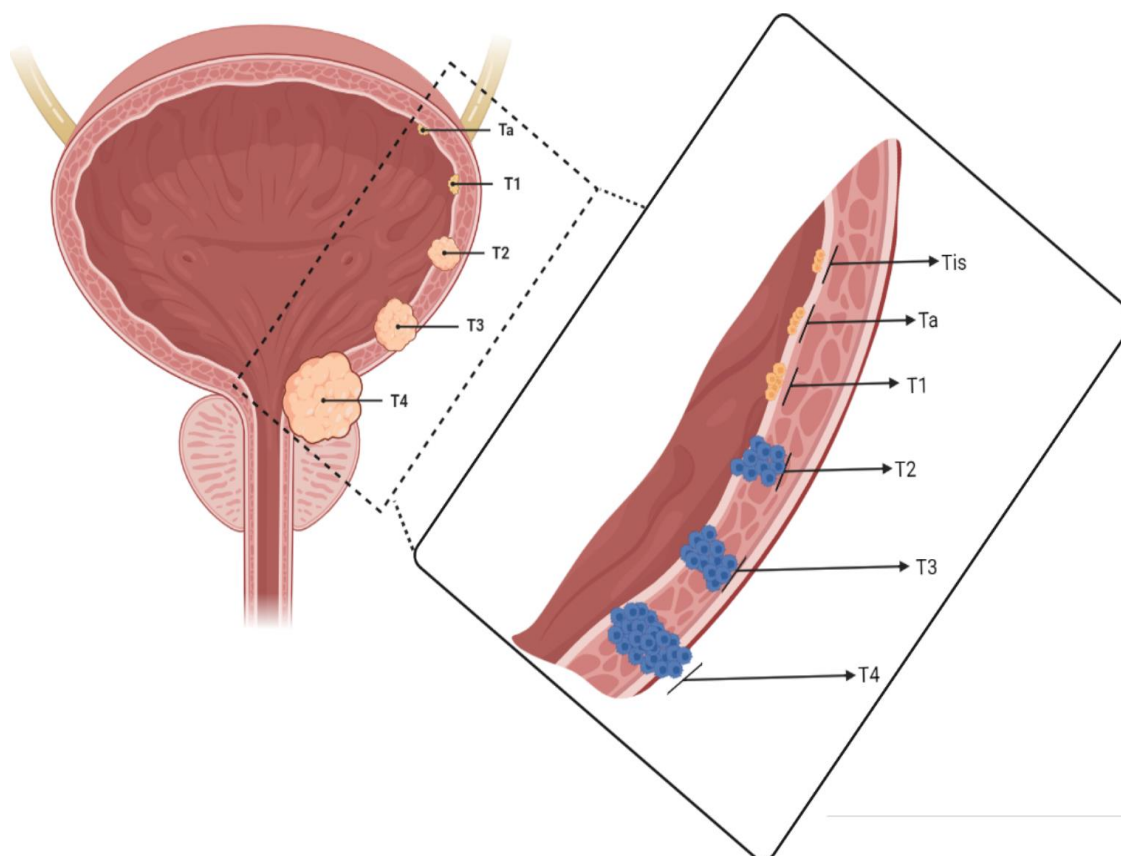
16 As neoplasias não invasivas ao músculo compõem cerca de 75% dos
 17 casos de CUB, por outro lado, 15% dos pacientes com tumor invasivo ao
 18 músculo são diagnosticados primeiramente com CUB não invasivo ao músculo
 19 (POWLES et al. 2022). Ressalta-se que os tumores não invasivos ao músculo
 20 apresentam taxa de recidiva aproximada de 50 a 70% e podem evoluir para
 21 tumores invasivos em 10 a 20% dos casos, devido à micrometástases (RÜBENS
 22 et al. 1988).

23 Em relação ao prognóstico são utilizados os parâmetros estadiamento
 24 TNM (Tumor, Nódulo, Metástase) (Tabela 1) e grau tumoral, os quais indicam a

1 invasão do tumor nas camadas da bexiga urinária bem como seu ritmo de
2 progressão (ONTARIO HEALTH, 2021). Os estádios referentes às
3 características tumorais Tis, Ta e T1 indicam respectivamente tumor confinado
4 na mucosa, carcinoma urotelial não invasivo ao músculo localizado na camada
5 superficial da parede da bexiga urinária e tumor invadindo a lâmina própria
6 (Figura 6) (ULBRIGHT et al 2016; BABJUK et al. 2022). Parâmetros T2, T3 e T4,
7 por sua vez, indicam as seguintes características: invasão da musculatura
8 adjacente, invasão do tecido perivesical e invasão de órgãos genitais ou da
9 parede pélvica ou abdominal (Figura 6) (ULBRIGHT et al. 2016; LENIS et al.
10 2020; ZHAN et al. 2022).

11

12 **Figura 6.** Esquematização dos estádios Tis, Ta, T1, T2, T3 e T4 referentes ao CUB, segundo a
13 classificação TNM.



14

15 A classificação TNM diz respeito ao tamanho tumoral, presença de células tumorais nos nódulos
16 e presença de metástases. Os estádios Tis, Ta e T1 são referentes ao CUB não invasivo, sendo
17 o Tis indicativo de carcinoma *in situ*, confinado à mucosa. Por outro lado, os estádios T2, T3 e
18 T4 indicam a presença de um tumor de bexiga invasivo, sendo o estágio T4 indicativo de invasão
19 em órgãos adjacentes como a próstata. **Fonte:** Próprio autor. Criado no Biorender.

20

1 O estadiamento patológico, abrange ainda, informações sobre os
2 linfonodos adjacentes e metástase a distância, os quais são denominados de N
3 e M respectivamente (Tabela 1). O primeiro é classificado como Nx, sem acesso
4 aos linfonodos próximos ao tumor, N0, linfonodos adjacentes sem metástase,
5 N1, metástase em apenas um linfonodo, N2, metástase em vários linfonodos
6 adjacentes e N3, presença de metástase em linfonodos ilíacos. No que diz
7 respeito ao parâmetro M, suas classes são M0, sem metástases distantes, M1a,
8 ausência de linfonodos regionais e M1b, metástases distantes (UNION FOR
9 INTERNATIONAL CANCER CONTROL, 2017).

10 O grau tumoral está relacionado ao ritmo de progressão do tumor,
11 podendo ser classificado em alto e baixo. O primeiro refere-se aos tumores de
12 elevada progressão e rápido crescimento, por outro lado, os tumores de baixo
13 grau apresentam crescimento e progressão lentos (ONTARIO HEALTH, 2021).

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

- 1 **Tabela 1.** Resumo das descrições dos estadiamentos tumorais: características do tumor, dos
 2 linfonodos regionais e metástases (classificação TNM).

Tabela de estadiamentos tumorais	
Nome	Características
Ta	Tumor confinado na mucosa
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> ou carcinoma urotelial não invasivo ao músculo
T1	Invasão da lâmina própria
T2	Invasão da musculatura adjacente
T2a	Invasão da camada superficial do músculo
T2b	Invasão das camadas mais profundas do músculo
T3	Invasão do tecido perivesical
T3a	Invasão identificada microscopicamente
T3b	Invasão identificada macroscopicamente, invade a massa extravesical
T4	Invasão de órgãos e tecidos próximos
T4a	Invasão de útero, estroma prostático, vesícula seminal ou vagina.
T4b	Invasão da parede pélvica ou da parede abdominal
Nx	Sem acesso aos linfonodos próximos ao tumor
N0	Linfonodos adjacentes sem metástase
N1	Metástase em apenas um linfonodo
N2	Metástase em vários linfonodos adjacentes
N3	Presença de metástase em linfonodos ilíacos
M0	Sem metástases distantes
M1a	Ausência de linfonodos regionais
M1b	Metástases distantes

- 3 Os cânceres são classificados de acordo com o TNM, que indica o tamanho tumoral, presença
 4 de células tumorais em nódulos linfáticos e de metástase. **Fonte:** adaptado de Union for
 5 International Cancer Control (2017).

6

- 7 Os tratamentos do CUB variam de acordo com o estadiamento tumoral.
 8 Neste sentido, neoplasias de bexiga não invasivas ao músculo de estadiamentos
 9 Ta e T1, são tratadas por meio de ressecção transuretral (RTU) (NATIONAL
 10 COLLABORATING CENTRE FOR CANCER, 2015; TASKOVSKA et al. 2020).
 11 Esta técnica, além de ser considerada um tratamento, é utilizada no diagnóstico
 12 e identificação dos estadiamentos e graus tumorais, de maneira a permitir a
 13 intervenção precoce em caso de tumores T1 de alto grau, desde que na
 14 amostragem haja margem de tecido muscular (KIM & PATEL, 2020). Caso esta
 15 seja feita de maneira incompleta, o tumor pode recidivar de forma mais

1 agressiva, evoluindo para um tumor invasivo estadiamento T2 ou maior, sendo,
2 portanto, necessário realizar uma RTU secundária (BRAUSI et al. 2002)

3 Após a realização da RTU são feitas sessões de quimioterapia ou de
4 terapia *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), sendo o melhor tratamento escolhido
5 mediante as características da neoplasia, bem como de seus estadiamentos
6 (SANGUEDOLCE et al. 2021). Estabeleceu-se que pacientes acometidos por
7 tumores de bexiga não invasivos e de risco baixo respondem melhor à
8 quimioterapia vesical, enquanto àqueles portadores de tumores não invasivos de
9 alto risco apresentam uma boa resposta com BCG e os de risco intermediário
10 podem ser tratados com ambas as terapias (SHORE et al. 2021).

11 A cistectomia radical, retirada total da bexiga urinária, é indicada em casos
12 de pacientes com tumores invasivos, podendo ser associada à quimioterapia
13 neoadjuvante, de maneira a evitar sua recidiva e aumentar a taxa de
14 sobrevivência (JUE et al. 2021).

15

16 2.2.3 Fatores de risco

17 O CUB tem como um de seus principais fatores de risco o hábito
18 tabagista, o qual aumenta o risco em torno de 50 a 60%, além de conferir
19 aumento da mortalidade (FREEDMAN et al. 2011). Sua relação com o
20 desenvolvimento de neoplasias depende do gênero, idade em que iniciou e
21 quantidade de cigarros consumidos por dia (THUN et al. 2013). Ressalta-se que
22 a continuidade deste hábito promove o aumento da probabilidade de ocorrência
23 de CUB invasivo ao músculo; contudo, sua interrupção dentro de 10 anos torna-
24 se um fator de proteção (BARBOSA et al. 2018; JAHRREIS et al. 2020).

25 Outro ponto a ser discutido em relação ao consumo de cigarro é a
26 metabolização da nicotina, a qual ativa os receptores beta-adrenérgico e
27 acetilcolina nicótico, responsáveis por ativar as vias de transdução relacionadas
28 à progressão tumoral e resistência ao tratamento, além de estarem relacionados
29 com mutações em genes de reparo de DNA (WOJTCZYK-MIASKOWSKA &
30 SCHLICHTHOLZ, 2019).

31 A exposição ocupacional a compostos como aminas aromáticas e
32 hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (tintas, solventes, metais entre outros)
33 constitui outro importante fator de risco ao desenvolvimento desta neoplasia
34 maligna (KOGEVINAS et al. 2003). Em *Sheffield*, Inglaterra, foi realizada uma

1 pesquisa que relatou que 62% dos pacientes com CUB atendidos pelo *Royal*
2 *Hallamshire Hospital* tiveram contato com carcinógenos como metais pesados,
3 produtos derivados de gás, óleo e tintas (REED et al. 2020).

4 Em mulheres que apresentaram menopausa precoce, os hormônios
5 esteroides estão associados à influência positiva quanto à carcinogênese de
6 bexiga, principalmente em fumantes (ABUFARAJ et al. 2020). Já os hormônios
7 masculinos podem ativar o receptor da Glutathione-S-transferase, atuantes na
8 metabolização dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tornando este
9 processo mais eficiente em homens do que em mulheres, desta forma,
10 fornecendo um fator de proteção aos homens (KARAGAS et al. 2005; JANISCH
11 et al. 2019).

12 Inflamações crônicas ou que perdurem por um longo período aumentam
13 o risco de desenvolvimento, invasão e metástase das neoplasias malignas de
14 bexiga urinária, contudo, elas também podem atuar como fator de proteção ao
15 induzirem resposta imune contra as células tumorais e/ou eliminá-las (HUANG
16 et al. 2020).

17

18 **2.3 PROTEÍNAS CANDIDATAS**

19 *2.3.1 BCL-2*

20 A apoptose foi definida por Kerr et al. (1972), como uma morte celular com
21 características morfológicas específicas, como redução do volume celular, ação
22 das caspases e fragmentação da cromatina. Ela é vital para a regulação do ciclo
23 celular e está relacionada à manutenção da homeostase, embriogênese, e morte
24 de células infectadas e/ou danificadas (KROEMER et al. 2009; KØNIG et al.
25 2019). Modificações das vias apoptóticas, portanto, podem acarretar doenças
26 autoimunes, cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer. Ressalta-se que as
27 vias moleculares pelas quais estas alterações ocorrem não são totalmente claras
28 (SINGH et al. 2019).

29 A família BCL-2 é composta por reguladores de apoptose podendo
30 apresentar tanto atuação inibitória, como da proteína BCL-2, ou ativadora, como
31 da proteína *BCL-2 associated X apoptosis regulator* (BAX) (KORSMEYER et al.
32 1993). Existem dois tipos de apoptose, sendo uma denominada extrínseca, ou
33 via receptora, e outra denominada intrínseca, ou via mitocondrial. Esta última é
34 regulada pela ação da família BCL-2 (GLAB et al. 2020).

1 Nas membranas mitocondriais estão localizados os receptores
2 específicos para cada membro da família BCL-2. Os receptores para as
3 proteínas BAX e *BCL-2 antagonist-killer* (BAK) estão inseridos, respectivamente,
4 nas membranas externa e interna. Quando estas proteínas são ativadas, alteram
5 a oligomerização das membranas mitocondriais, modificando, portanto, sua
6 permeabilidade (WEI et al. 2001). Formam, por conseguinte, um canal que
7 permite a saída da enzima citocromo C, do espaço intermembranas mitocondrial
8 para o citoplasma, fazendo com que a morte celular seja iniciada por meio da
9 ativação das caspases citoplasmáticas, grupo de enzimas capazes de clivar
10 outras proteínas, além de acarretar a perda de DNA mitocondrial (KLUCK et al.
11 1997).

12 A proteína BCL-2 possui duas isoformas denominadas BCL-2 α e BCL-2 β ,
13 o primeiro é tido como antiapoptótico e o segundo ainda não foi totalmente
14 caracterizado. A isoforma BCL-2 α liga-se à proteína BAX (Figura 7), de maneira
15 a impedir sua oligomerização e, por conseguinte, a ocorrência da apoptose
16 (ALBERTS et al. 2017).

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

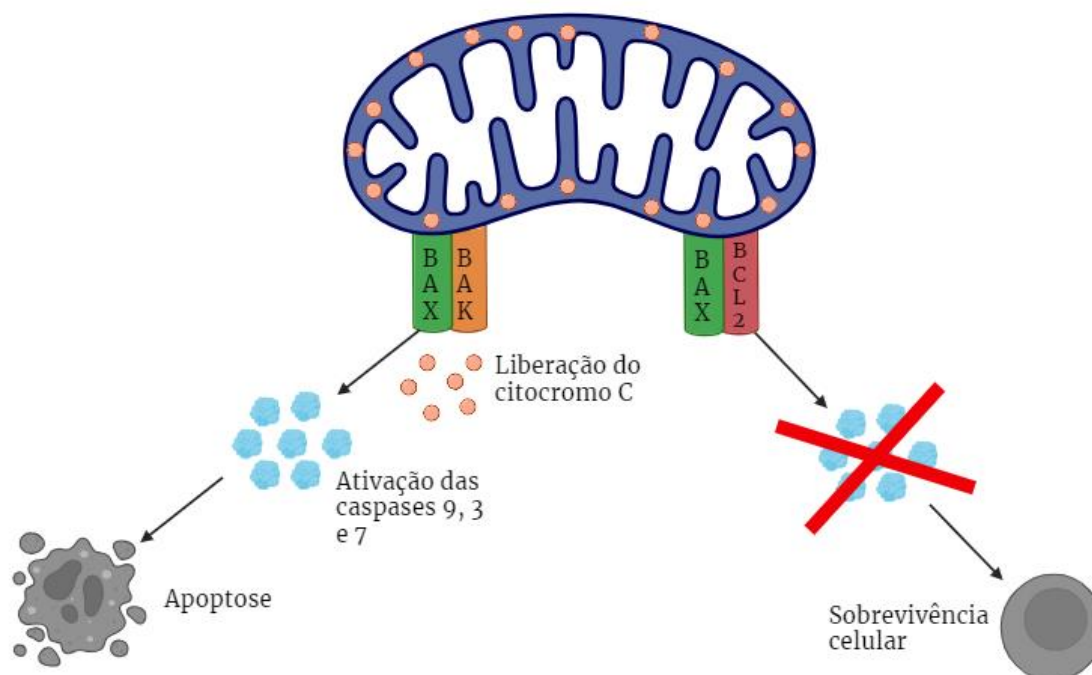
28

29

30

31

1

2 **Figura 7.** Mecanismo de inibição da via apoptótica intrínseca pela proteína BCL-2.

3

4 Na figura é possível observar a ligação entre as proteínas BAX e BCL-2 de modo a inibir a
 5 formação do canal pelo qual ocorre a saída de citocromo C e a ativação das caspases 9, 3 e 7,
 6 assim tais enzimas não realizam o processo de desintegração nuclear e fragmentação do
 7 citoplasma, por conseguinte, a morte celular não ocorre. Criado no Biorender **Fonte:** Próprio
 8 autor.

9

10 A inibição contínua da apoptose é considerada chave no desenvolvimento
 11 tumoral, tendo em vista que as células passam a ser imortais, proliferando
 12 constantemente e promovendo o crescimento do tumor (KERR et al. 1972).
 13 Desta forma, já foi observada a superexpressão de *BCL-2* em diversos tipos de
 14 neoplasias malignas, sendo o respectivo gene classificado como oncogene, que
 15 tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de tratamentos no câncer
 16 (CHAUDHARY et al. 1999).

17 Em estudo realizado por Nakopoulou et al (1998) envolvendo pacientes
 18 com CUB, foi identificado um aumento da expressão de BCL-2 em indivíduos
 19 acometidos por tumores de baixo grau. Ressalta-se que BCL-2 é encontrada em
 20 estudos realizados a partir de culturas de células de CUB, indicando que estas
 21 *in vivo* expressam tal proteína (LONG et al. 2019). Ocorre, ainda, diminuição da
 22 expressão de BCL-2 em culturas de células tumorais de bexiga quando tratadas

1 com ácido gálico, indicando uma redução do processo inibitório da apoptose
2 (ZENG et al. 2020).

3 Um estudo envolvendo a BCL-2 como marcador preditivo de resposta a
4 tratamento neoadjuvante com cisplatina, indutora de aductos no DNA, de forma
5 a induzir morte celular, e cistectomia radical, retirada total da bexiga urinária, em
6 pacientes com CUB invasivo, indicou que 38% dos tumores apresentaram uma
7 imunomarcacão positiva. Contudo, ao acompanhar os pacientes envolvidos na
8 pesquisa por cinco anos, observou-se que pacientes cuja expressão de BCL-2
9 foi negativa, apresentaram uma resposta melhor a esta combinacão terapêutica
10 (TURKER et al. 2019).

11 Dae et al. (2022), avaliando cultura de células e tratamento para o CUB,
12 mediante a aplicacão de diferentes concentraçoes de nanopartículas de prata,
13 observaram reduçao da expressao de *BCL-2* e aumento da expressao de *BAX*.
14 Dessa forma, evidenciaram uma maior probabilidade de sucesso terapêutico,
15 tendo em vista o aumento da taxa de apoptose das células tumorais.

16

17 2.3.2 γ H2AX

18 Danos de DNA quando não reparados pelo sistema de reparo celular,
19 tornam-se mutaçoes. Sua taxa de ocorrencia de forma espontânea em
20 determinado sitio de um cromossomo varia entre 10^{-6} à 10^{-11} por ciclo de
21 replicacão de DNA (WATSON et al. 2015). Quando ocorrem em genes que
22 codificam proteínas dos pontos de checagem (*checkpoints*) podem torná-los
23 desregulados, por conseguinte, ocasionar instabilidade genética, acarretando o
24 desenvolvimento de doenças (BOUWMAN & JONKERS, 2012).

25 Os principais tipos de mecanismos de reparo de DNA são: reparo por
26 excisao de base, reparo por excisao de nucleotideo, reparo de mal pareamento,
27 reparo de dupla fita de DNA. No primeiro ocorre a excisao da base nitrogenada
28 incorreta, substituindo-a pela base correspondente à fita molde do DNA
29 (LINDAHL et al. 1997). No segundo tipo ocorre o corte de doze a treze
30 nucleotideos em sequencia, quando identificada a lesao no DNA, sendo esta
31 sequencia preenchida por uma nova sequencia correta de nucleotideos
32 (SANCAR & RUPP, 1983). Modrich, laureado pelo prêmio Nobel em 2015,
33 descreveu o reparo de mal pareamento (*mismatch repair*) como sendo o reparo
34 de bases nitrogenadas mal pareadas. Este mau pareamento é reconhecido por

1 meio da fita molde que se encontra metilada e, posteriormente, a base mal
2 pareada é substituída pela correta (MODRICH, 2016).

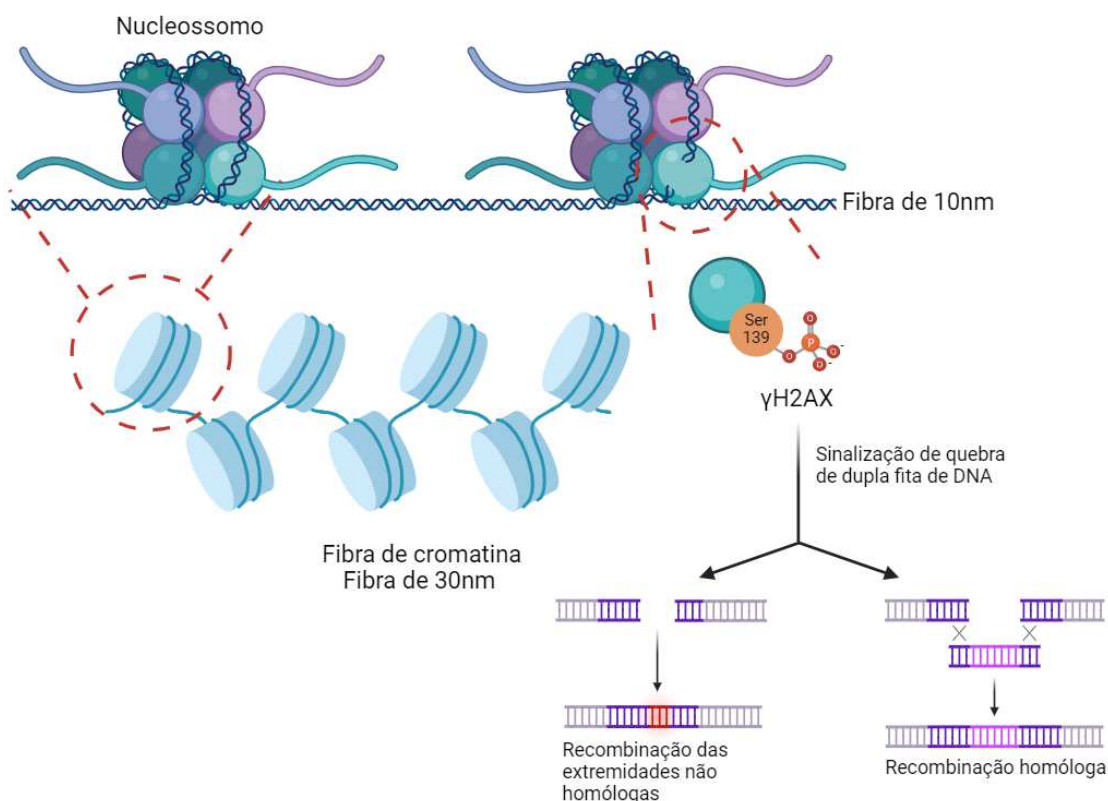
3 O reparo de quebra de fita dupla de DNA pode ocorrer em duas vias: união
4 das extremidades não homólogas e recombinação homóloga. O mau
5 funcionamento ou a ausência de reparo por essas vias, pode promover
6 alterações cromossômicas, levando ao desenvolvimento de inúmeras doenças
7 como o câncer. A via de união das extremidades não homólogas realiza a ligação
8 entre as extremidades de DNA mesmo que estas não sejam complementares a
9 sequência da fita molde, ou seja, não há uma dependência em relação à
10 homologia dos cromossomos, enquanto na via de reparo por recombinação
11 homóloga, há a necessidade de uma sequência molde complementar, que se
12 encontra no cromossomo homólogo daquele portador da lesão genética
13 (GRIFFITHS et al. 2022).

14 Ressalta-se que as proteínas histonas têm um importante papel para os
15 processos de reparo da molécula de DNA, pois estas são constituintes da
16 cromatina, como representado na Figura 8 (KORNBERG, 1974). O subtipo da
17 histona H2A, denominado histona H2AX, apresenta como função a sinalização
18 de quebra de fita dupla (Figura 8), recrutando as proteínas do sistema de reparo
19 desse dano. Esta proteína liga-se às regiões de quebra de fita dupla de DNA e,
20 posteriormente, tem sua serina 139 fosforilada pela ação das proteínas
21 quinases *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM), passando a receber o nome de
22 γ -H2AX, de maneira a sinalizar tal lesão para os mecanismos de reparo
23 (ROGAKOU et al. 1998).

24 A histona γ -H2AX interage com inúmeras proteínas sendo as principais:
25 *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1), *MRX complex in yeast*
26 (MRN), complexo *breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1) /*BCRA1-*
27 *associated RING domain protein 1* (BARD1), formando um foco de quebra de
28 dupla fita de DNA (PAULL et al. 2000). Sua interação com a proteína MDC1, por
29 exemplo, amplifica a sinalização de γ -H2AX, de maneira a recrutar e reter as
30 proteínas do reparo em resposta ao dano de DNA (STUCKI et al. 2005).

31
32
33
34

1 **Figura 8.** Sinalização de dano de dupla fita de DNA pela histona modificada γ -H2AX.



A H2AX reconhece o dano de dupla fita de DNA, posteriormente sua serina 139 é fosforilada (γ -H2AX) pelas ação das proteínas quinases *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM), desta forma, ocorre a sinalização deste dano e o recrutamento do sistema de reparo de dupla fita de DNA, ocorrente em duas vias: união das extremidades não homólogas e recombinação homóloga. Criado no Biorender. **Fonte:** próprio autor.

Assim, a expressão de γ -H2AX está associada a dano de DNA podendo ser considerada um biomarcador para diferentes cânceres. Uma análise inserida na plataforma “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA) realizada em 2016 por Rezaeian et al. mostrou que tumores de pulmão, mama, ovário, cabeça e pescoço, estômago, cólon-retos e fígado destacam-se pela expressão elevada do gene *H2AX*. Além disso, este gene vem sendo associado a carcinomas hepáticos (MATSUDA et al 2012) e uroteliais (CHEUNG et al. 2009), bem como a um pior prognóstico em pacientes portadores de câncer de mama triplo negativo (NAGELKERKE et al. 2015).

Segundo Hoffmann & Schulz (2021), estudos que avaliam a relação das histonas com o CUB são escassos na literatura. Trabalhos do Instituto Nacional de Ciências Médicas, localizado em Kanagawa, Japão, indicaram que após administração de tratamentos com genotóxicos carcinogênicos relacionados

1 com o CUB, há um aumento da imunomarcção da histona γ -H2AX em células
2 uroteliais de ratos na região nuclear, indicando a possibilidade desta proteína ser
3 utilizada como marcador tumoral da neoplasia maligna de bexiga (SUZUKI et al.
4 2020; YAMADA et al. 2020). Adicionalmente, ao realizar um estudo a respeito da
5 exposiçō de amins aromáticas utilizadas na agricultura japonesa, as quais
6 estāo relacionadas com a formaçō de quebra de fita dupla em células uroteliais
7 de bexiga, Qi et al. (2020) identificaram uma forte marcaçō para a proteína γ -
8 H2AX pela técnica de imunofluorescência.

9 Dentro deste cenário, as proteínas BCL-2 e γ -H2AX emergem como
10 candidatas a biomarcadores devido à sua relevância nos processos de apoptose
11 e reparo de DNA, respectivamente. Esses processos desempenham um papel
12 crucial no ciclo celular, e suas alteraçōes têm um impacto significativo na
13 carcinogênese.

14

1 3. OBJETIVOS

2 3.1 OBJETIVOS GERAIS

3 O objetivo do presente trabalho foi padronizar e analisar os perfis de
4 imunomarcção das proteínas candidatas BCL-2 e γ -H2AX em amostras
5 teciduais malignas da bexiga e relacioná-los a parâmetros prognósticos,
6 principalmente invasão ao músculo e recidiva tumoral.

8 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 9 ● Levantar e organizar os dados dos pacientes portadores de
10 tumores malignos da bexiga do Biorrepositório do Laboratório de
11 Mutagênese e Oncogenética (LAMON);
- 12 ● Selecionar pacientes com e sem invasão à camada muscular e
13 com e sem recidiva tumoral;
- 14 ● Analisar os prontuários e os questionários pessoais pertencentes
15 aos pacientes selecionados;
- 16 ● Obter as amostras para realizar os cortes histológicos e
17 confeccionar lâminas para seleção de tecido tumoral e não tumoral
18 adjacente, e posterior análise do perfil de imunomarcção das
19 proteínas candidatas;
- 20 ● Padronizar e analisar o perfil de imunomarcção das proteínas
21 BCL-2 e γ -H2AX em amostras teciduais de pacientes portadores
22 de CUB;
- 23 ● Correlacionar a imunomarcção das proteínas com parâmetros
24 prognósticos, clínicos e de exposição ambiental, bem como em
25 relação a idade e ao sexo;
- 26 ● Verificar o potencial das proteínas candidatas como marcadores de
27 prognóstico para o CUB.

28

1 4 MATERIAL E MÉTODOS

2 4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

3 Foram selecionados 80 indivíduos a partir do banco de pacientes com
4 CUB pertencente ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON),
5 obtidos por meio de uma parceria com o Hospital do Câncer de Londrina (HCL).
6 Solicitou-se os blocos teciduais parafinados ao Setor de Patologia do HCL, que
7 foram retirados mediante a autorização dos pacientes por meio da assinatura do
8 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê
9 Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CAAE:
10 47092521.2.1001.5231). Todos os pacientes responderam a um questionário
11 pessoal fornecendo informações sobre exposição ambiental (exposição
12 ocupacional, hábitos tabagista e etilista), clínicos (diabetes, hipertensão,
13 medicamento de uso contínuo, histórico familiar de câncer), além de idade e sexo
14 (Anexo V). Adicionalmente, coletou-se dados a partir dos prontuários médicos
15 sobre o intervalo de tempo decorrido entre tumor primário e a primeira recidiva,
16 grau tumoral, estadiamento, invasão muscular, número de recidivas e perfil
17 imunohistoquímico da proteína p53.

18 Os pacientes foram divididos em dois grupos: invasivos (n=19) e não
19 invasivos (n=61) ao músculo. A partir das informações a respeito das recidivas
20 tumorais, o grupo de pacientes “não invasivo ao músculo” foi subdividido em:
21 “não invasivo sem recidivas” (n=24), “não invasivo com uma recidiva” (n=18) e
22 “não invasivo com duas ou mais recidivas” (n=19) (Figura 9).

23

24

25

26

27

28

29

30

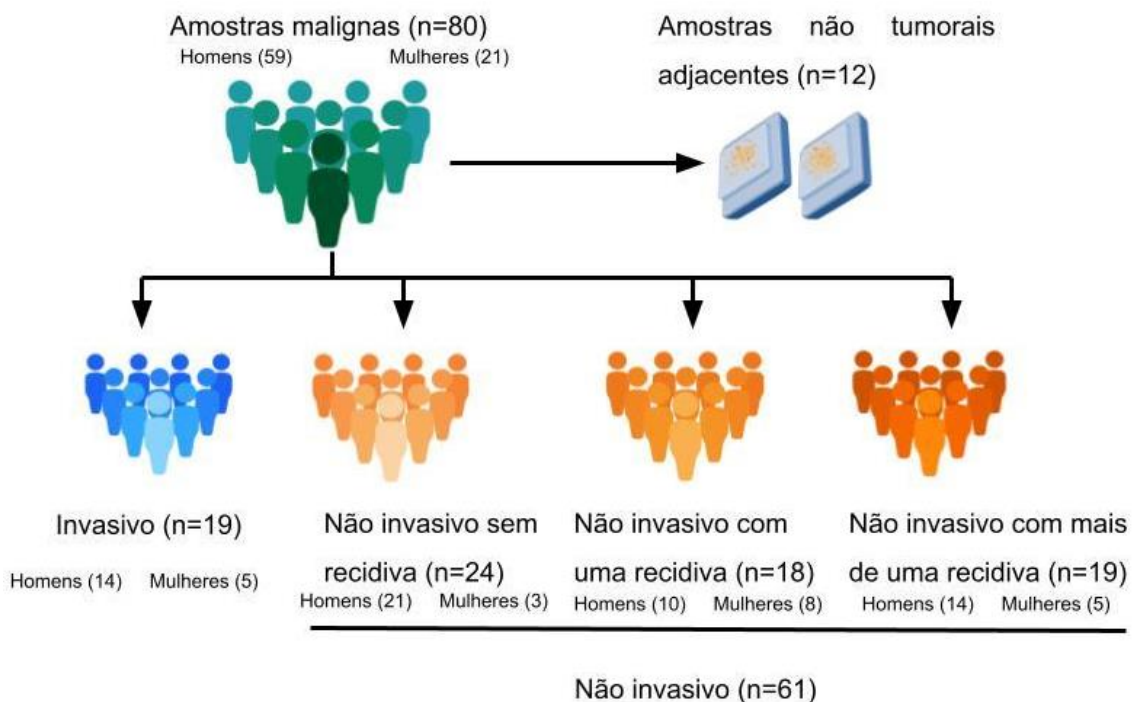
31

32

33

34

1 **Figura 9.** Divisão da amostra total nos grupos "invasivo" e "não invasivo". Composição dos subgrupos
 2 amostrais: "não invasivo sem recidiva", "não invasivo com uma recidiva" e "não invasivo com mais de uma
 3 recidiva.



4
 5 Foram selecionadas 80 amostras de CUB, que foram agrupadas de acordo com presença de
 6 invasão à camada muscular adjacente. Neste sentido foram compostos dois subgrupos: "não
 7 invasivo" e "invasivo". Posteriormente, o grupo não invasivo foi subdividido de acordo com a
 8 presença de recidivas: "não invasivo sem recidiva", "não invasivo com uma recidiva" e "não
 9 invasivo com mais de uma recidiva". Criado no Canva. **Fonte:** próprio autor.

10

11 **4.2 CORTES DAS AMOSTRAS DE TUMOR DE BEXIGA INCLUÍDAS EM PARAFINA**

12 Os blocos teciduais foram cortados com auxílio de um micrótomo (Leica
 13 RM226, Leica, Wetzlar, ALE) em espessura de 6 micrômetros. Os cortes foram
 14 corados com hematoxilina e eosina e avaliados por médico patologista quanto a
 15 presença de tecido tumoral maligno e adjacente não tumoral em cada amostra.
 16 As amostras foram posteriormente cortadas e dispostas em lâminas silanizadas
 17 (StarFrost®, Knittel glass, Braunschweig ALE) para a realização da
 18 imunohistoquímica (IHQ).

19 Ressalta-se que durante o processo de RTU, em que é retirado o tecido
 20 tumoral, não é realizada a raspagem do tecido normal adjacente. Por esse
 21 motivo, foram obtidas apenas 12 amostras teciduais não tumorais dos mesmos
 22 pacientes.

23

1 **4.3. IMUNOHISTOQUÍMICA INDIRETA**

2 Foi utilizada a técnica de IHQ indireta segundo Pereira et al (2022),
3 padronizada por nosso grupo de pesquisa, com algumas modificações
4 referentes às temperaturas dos ciclos de recuperação antigênica.

5 No primeiro dia realizou-se a recuperação antigênica, as lâminas foram
6 submergidas em uma solução de acetato e citrato cujo pH é 6, posteriormente
7 foram aquecidas em forno microondas Panasonic Junior Smart (Panasonic da
8 Amazônia S/A, Manaus, A, BRA) durante quatro minutos à potência 80 W e duas
9 vezes por cinco minutos à potência 60 W, atingindo uma temperatura média de
10 96°C. Após atingir a temperatura ambiente, a solução de recuperação antigênica
11 foi retirada e as lâminas foram lavadas em água corrente três vezes. As próximas
12 etapas foram bloqueio da peroxidase endógena, seguida pela adição do tampão
13 super block (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA).

14 Os anticorpos primários anti-BCL-2 (Monoclonal, clone 124, código
15 MA126233, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) e anti- γ -H2AX
16 (Monoclonal, clone GT2311, código MA527753, Thermo Fisher Scientific,
17 Rockford, IL, EUA) foram acrescidos e incubados à 4°C overnight. No segundo
18 dia ocorreu a incubação com o anticorpo secundário biotinilado durante 45
19 minutos (Mouse/Rabbit HRP Abcam, Cambridge, MA, EUA). A coloração das
20 amostras foi feita mediante ao cromógeno 3,3'-diaminobenzidine (DAB) durante
21 1 minuto, seguida pela contra coloração por hematoxilina durante 15 segundos.

22 Foi realizada a padronização da diluição dos anticorpos BCL-2 e γ -H2AX
23 em tecido de tonsila palatina (controle positivo de imunomarcacão para ambas
24 as proteínas) de acordo com instruções do fabricante. Utilizou-se cortes de
25 amostra tecidual de tonsila palatina distribuídos em três lâminas nas seguintes
26 diluições: BCL-2 1:50 (v/v; μ l), BCL-2 1:100 (v/v; μ l); γ -H2AX 1:100 (v/v; μ l), γ -
27 H2AX 1:500 (v/v; μ l), γ -H2AX 1:1000 (v/v; μ l). Tais concentrações foram
28 escolhidas para as baterias testes de diluição do anticorpo de acordo com suas
29 bulas, considerando-se a concentração indicada pelo fabricante, bem como
30 concentrações menores e maiores. Foi selecionada a concentração de 1:100
31 (v/v; μ l) para ambos os anticorpos após avaliação por médico patologista.
32 Ressalta-se que após a incubação dos anticorpos e das demais soluções, foram
33 realizadas lavagens dos cortes histológicos com água destilada e tampão salino-
34 fosfato (PBS).

1 Em todas as baterias foram realizados controles positivos (tecido de
2 tonsila palatina) e negativos onde o anticorpo primário foi substituído por PBS.
3 As lâminas foram analisadas por médico patologista especializado em IHQ
4 utilizando uma classificação semiquantitativa em sistema de cruzes: marcação
5 ausente (-), marcação fraca (+) e forte (+++). Foram avaliados tecido tumoral e
6 não tumoral adjacente (quando presente), núcleo e citoplasma, além do infiltrado
7 linfocitário (controle interno), em todas as amostras. Destaca-se que o tecido não
8 tumoral adjacente avaliado consistiu apenas de tecido epitelial não tumoral
9 presente nas amostras. Destaca-se que para a proteína BCL-2 o infiltrado
10 linfocitário foi utilizado como controle positivo, pois quando presente (n=73) se
11 mostrou sempre marcado (Figura 2).

12

13 **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

14 Com o intuito de avaliar diferenças entre médias de idades dos grupos
15 amostrais foi realizado o teste T-student. Objetivando averiguar associações
16 entre as imunomarcações de BCL-2 e γ -H2AX em relação a parâmetros
17 prognósticos (tempo da primeira recidiva, grau tumoral e estadiamento
18 patológico, imunomarcação de p53), parâmetros clínicos (diabetes, hipertensão,
19 medicamento de uso contínuo e histórico familiar de câncer), de exposição
20 ambiental (exposição ocupacional, hábitos tabagista e etilista), subgrupos
21 amostrais (invasão muscular e recidiva tumoral), idade, sexo, bem como entre
22 as proteínas, foram realizados os testes de Qui-quadrado e de Fisher. Possíveis
23 correlações entre as variáveis foram analisadas pelo teste de correlação Tau-b
24 de Kendall.

25 Todas as análises foram realizadas no *software IBM® SPSS® Statistics for*
26 *Windows*, versão 23.0.1 (IBM® Corp. Armonk N.Y. EUA), utilizando-se como
27 nível de significância o valor de 5%.

1 5 CAPÍTULO I

2

3 **Expressão tecidual de BCL-2 e γ -H2AX: investigação de associação com** 4 **invasão muscular e recidiva tumoral em carcinoma urotelial de bexiga**

5

6 **Resumo**

7 O carcinoma urotelial de bexiga (CUB) é uma neoplasia maligna do trato urinário
8 de alta prevalência no mundo e que apresenta elevada taxa de recidiva tumoral.
9 Sabe-se que o gene BCL-2 (*BCL2 apoptosis regulator*) codifica uma proteína
10 mitocondrial que regula a morte celular programada por apoptose, enquanto o
11 gene H2AX (*H2A.X variant histone*) codifica uma histona responsável por regular
12 e sinalizar processos de instabilidade genômica. Objetivou-se realizar a análise
13 dos perfis de imunomarcção das respectivas proteínas em 80 amostras
14 teciduais de pacientes com tumores malignos de bexiga (19 invasivos e 61 não
15 invasivos ao músculo) por imunohistoquímica (IHQ) e relacioná-los com
16 prognóstico, principalmente recidiva tumoral e invasão muscular. Os resultados
17 na amostra total demonstraram que a expressão de BCL-2 foi citoplasmática e
18 ausente em metade das amostras (n=40), já em relação aos grupos amostrais,
19 esta ausência de expressão foi prevalente tanto no grupo “invasivo” (52,6%)
20 quanto no grupo “não invasivo” (49,2%). Em relação a γ -H2AX, foi observada
21 expressão nuclear forte (41,7%), que predominou nas amostras invasivas
22 (52,6%). O perfil de imunomarcção de ambas as proteínas não se mostrou
23 associado à recidiva tumoral ou invasão muscular e não foram constatadas
24 associações significativas em relação aos demais parâmetros prognósticos (grau
25 tumoral, estadiamento patológico e imunohistoquímica de p53). Adicionalmente,
26 não foram identificadas correlações significativas considerando-se as marcações
27 de BCL-2 e γ -H2AX entre si no tecido tumoral (p=0,158). Conclui-se que as
28 proteínas BCL-2 e γ -H2AX, apesar de possuírem expressão no tecido tumoral
29 maligno, não se mostraram como marcadores de prognóstico nas presentes
30 amostras, principalmente considerando-se invasão muscular e recidiva tumoral.

31

32 Palavras-chaves: expressão proteica; reincidência tumoral; marcadores
33 prognósticos.

34

1 **Introdução**

2 O carcinoma urotelial de bexiga (CUB) é considerado o nono tipo de
3 neoplasia maligna mais comum no mundo, e o décimo terceiro em mortalidade
4 (GLOBOCAN, 2024). Estes tumores malignos são classificados em não invasivo
5 ao músculo ou invasivo ao músculo, com a primeira classe apresentando uma
6 taxa de ocorrência equivalente a 75% dos casos (POWLES et al. 2022). Uma
7 elevada porcentagem dos pacientes com CUB não invasivo recidivam em
8 apenas 1 ano e 31 a 78% em 5 cinco anos (SYLVESTER et al. 2006); além disso,
9 podem evoluir para tumores invasivos em 10 a 20% dos casos, devido à
10 micrometástases (RÜBENS et al. 1988). Esta elevada taxa de reincidência gera
11 alterações na qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que os tratamentos
12 afetam a saúde física, psicológica e social (SMITH et al. 2018), ressaltando a
13 necessidade de marcadores que possam predizer e alterar a conduta clínica dos
14 pacientes.

15 O processo de morte celular programada por apoptose é regulado por um
16 grupo de proteínas denominado família BCL-2, cujos receptores são
17 encontrados nas membranas mitocondriais (KRAJEWSKI et al. 1993). A proteína
18 *BCL2 apoptosis regulator* (BCL-2) possui papel inibitório no processo de
19 apoptose, pois impede a formação dos canais das proteínas *BCL2 associated X*
20 *apoptosis regulator* (BAX) e *BCL-2 antagonist-killer* (BAK) na membrana
21 mitocondrial externa e a liberação das enzimas citocromo C, inibindo a ativação
22 das caspases (SCHENDEL et al. 1997; MIKHAILOV et al. 2001). Estudo
23 envolvendo a proteína BCL-2 como marcador preditivo de resposta a tratamento
24 em pacientes com CUB invasivo, demonstrou que a ausência de marcação foi
25 indicativa de melhor resposta terapêutica (TURKER et al. 2019).

26 A histona *H2A variant histone* (H2AX), é conhecida principalmente por
27 desempenhar um papel central na sinalização de quebras de fita dupla no DNA
28 (DSBs), recrutando proteínas do sistema de reparo. Ao se ligar nas regiões de
29 DSBs induzidas por agentes genotóxicos, a serina 139 é fosforilada, passando
30 a receber o nome de γ -H2AX (gamma-H2AX), sinalizando o local da lesão e
31 recrutando proteínas de mecanismos de reparo de DNA específicos (ROGAKOU
32 et al. 1998). Outra função de γ -H2AX está relacionada com a morte celular
33 programada, uma vez que a persistência dos focos de γ -H2AX podem ser
34 indicativos de dano persistente/irreparável ao DNA. Nesses casos, as células

1 podem entrar em apoptose e evitar a propagação de células danificadas. Assim,
2 a expressão de γ -H2AX pode ser considerada um biomarcador para diferentes
3 cânceres. Uma análise na plataforma “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA)
4 realizada em 2016 por Rezaeian et al., mostrou que tumores de pulmão, mama,
5 ovário, cabeça e pescoço, estômago, cólon-retos e fígado destacam-se pela
6 expressão elevada do gene *H2AX*. Além disso, a expressão da proteína γ -H2AX
7 vem sendo associado a carcinomas hepáticos (MATSUDA et al. 2012) e
8 uroteliais (CHEUNG et al. 2009), bem como a um pior prognóstico em pacientes
9 portadores de câncer de mama triplo negativo (NAGELKERKE et al. 2015), tendo
10 em vista que o aumento na expressão desta proteína indica quantidades
11 significativas de quebras de dupla fita de DNA, que não são necessariamente
12 são reparadas.

13 A correlação entre as proteínas γ -H2AX e BCL-2 pode fornecer
14 informações sobre os mecanismos subjacentes à resposta ao dano no DNA, à
15 regulação da apoptose e à progressão da doença. É possível que a expressão
16 de BCL-2 module a resposta celular a danos no DNA, afetando a eficiência dos
17 mecanismos de reparo do DNA. A presença de altos níveis de BCL-2 poderia
18 indicar uma supressão à morte celular por apoptose e promoção da
19 sobrevivência celular, mesmo com danos no DNA, levando à instabilidade
20 genômica e a maior progressão do câncer. Por isso, o equilíbrio da marcação de
21 proteínas de resposta a danos ao DNA (mediado por γ -H2AX) e da inibição da
22 morte celular por apoptose (mediada por BCL-2) podem estar refletindo o estado
23 patológico das amostras com influência na sobrevivência e recorrência dos
24 tumores de bexiga.

25 Em células malignas de pulmão, foi observada superexpressão de BCL-
26 2, a qual prolongou a expressão de γ -H2AX em células expostas à radiação
27 ionizante. Estes efeitos também foram observados em células tumorais de
28 mama, demonstrando que a regulação negativa do reparo de dupla fita pela
29 proteína BCL-2 não é específica para uma linhagem celular tumoral (WANG et
30 al. 2008), ressaltando a relevância de se estudar as moléculas BCL-2 e γ -H2AX
31 de forma conjunta em amostras tumorais malignas.

32 Considerando que a desregulação do ciclo celular, a inibição da morte
33 celular programada e o aumento da instabilidade genômica consistem em
34 processos de extrema importância no contexto da tumorigênese (HANAHAN,

1 2022), o presente estudo objetivou analisar os perfis de imunomarcção das
2 proteínas BCL-2 e γ -H2AX em amostras teciduais de CUB, e correlacioná-los
3 entre si e com parâmetros prognósticos, principalmente invasão à camada
4 muscular e recidiva tumoral, na busca por marcadores candidatos para uso
5 futuro nesta neoplasia maligna.

6

7 **Metodologia**

8 **Seleção da amostra**

9 Amostras teciduais de CUB incluídas em parafina de 80 pacientes foram
10 obtidas no setor de Patologia do Hospital de Câncer de Londrina (HCL). Todos
11 os pacientes autorizaram a retirada do material e acesso aos dados clínico-
12 patológicos por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e
13 Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo
14 Seres Humanos (CAAE: 47092521.2.1001.5231). Adicionalmente, todos os
15 pacientes responderam a um questionário pessoal fornecendo informações
16 sobre exposição ambiental (exposição ocupacional, hábito tabagista e etilista) e
17 parâmetros socioculturais (sexo e idade), clínicos (diabetes, hipertensão,
18 medicamento de uso contínuo, histórico familiar de câncer).

19 Os pacientes foram divididos em dois grupos amostrais: invasivo ao
20 músculo (n=19) e não invasivo ao músculo (n=61). A partir das informações
21 obtidas dos prontuários médicos, o grupo “não invasivo ao músculo” foi
22 subdividido: sem recidiva (n=24), com uma recidiva (n=18) e com duas ou mais
23 recidivas (n=19) (Figura 1). Além da presença e do número de recidivas, foram
24 coletadas informações sobre o intervalo de tempo decorrido entre o tumor
25 primário e a primeira recidiva, o grau tumoral, o estadiamento patológico e a
26 expressão da proteína p53.

27

28

29

30

31

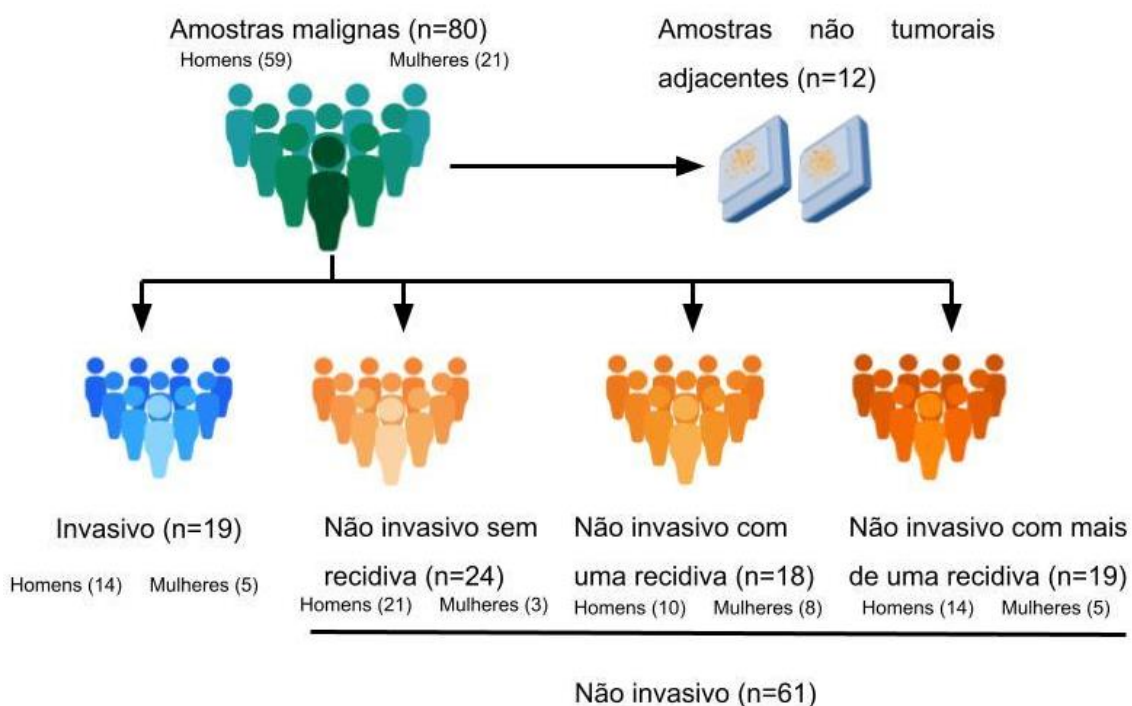
32

33

34

1

2 **Figura 1.** Divisão da amostra total de pacientes de CUB nos grupos "invasivo" e "não invasivo". Composição
 3 dos subgrupos amostrais: "não invasivo sem recidiva", "não invasivo com uma recidiva" e "não invasivo
 4 com mais de uma recidiva".



5

6 Foram selecionadas 80 amostras de CUB, que foram agrupadas de acordo com invasão à
 7 camada muscular adjacente: "não invasivo" e "invasivo". Posteriormente, o grupo não invasivo
 8 foi subdividido de acordo com a presença de recidivas: "não invasivo sem recidiva", "não invasivo
 9 com uma recidiva" e "não invasivo com mais de uma recidiva". Criado no Canva. **Fonte:** próprio
 10 autor.

11

12 Dada a dificuldade na obtenção de tecidos adjacentes não tumorais de
 13 bexiga, foram analisadas 12 amostras dos mesmos pacientes, objetivando a
 14 descrição do perfil de expressão das proteínas BCL-2 e γ -H2AX nas
 15 proximidades do tumor maligno. Foi considerado como tecido adjacente não
 16 tumoral apenas o tecido epitelial de bexiga.

17

18 **Imunohistoquímica indireta (IHQ)**

19 As amostras teciduais embebidas em parafina foram cortadas em
 20 micrótomo (Leica RM226, Leica, Wetzlar, ALE) na espessura de 6 micrômetros
 21 e dispostas em lâminas silanizadas (StarFrost®, Knittel glass, Braunschg ALE).
 22 Posteriormente foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação

1 da presença de tecido tumoral maligno e/ou adjacente não tumoral para
2 posteriores análises de imunomarcação.

3 A IHQ foi realizada baseada em protocolo prévio estabelecido por nosso
4 grupo de pesquisa (Pereira et al. 2022). Os anticorpos primários anti-BCL-2
5 (Monoclonal, clone 124, código MA126233, Thermo Fisher Scientific, Rockford,
6 IL, EUA) e anti-H2AX (Monoclonal, clone GT2311, código MA527753, Thermo
7 Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) foram acrescidos na concentração de 1:100
8 (v/v; μ l) e incubados a 4°C overnight. Foi utilizado anticorpo secundário
9 biotinizado conjugado com estreptavidina (Mouse/Rabbit HRP Abcam,
10 Cambridge, MA, EUA) e coloração com 3,3'-diaminobenzidine (DAB) durante 1
11 minuto, seguida pela contracoloração por hematoxilina durante 15 segundos.

12 Amostras teciduais de tonsila palatina com expressão positiva para
13 ambas as proteínas foram utilizadas na padronização da diluição dos anticorpos
14 primários e posteriormente como controle positivo em todos os experimentos.
15 Controles negativos de especificidade dos anticorpos primários foram realizados,
16 onde estes foram substituídos por solução tampão salino-fosfato (PBS). Os
17 experimentos foram realizados incluindo de 10 a 15 amostras tumorais de bexiga
18 e uma de tecido de tonsila palatina por bateria de coloração.

19 Todas as lâminas foram analisadas por médico patologista especializado
20 em IHQ, que percorreu o campo total do corte tecidual (em aumento de 40X,
21 microscópio Nikon eclipse E200) considerando: marcação ausente (-), fraca (+)
22 e forte (+++). Foram avaliados tecido tumoral e não tumoral adjacente (tecido
23 epitelial de bexiga), núcleo, citoplasma e infiltrado linfocitário (controle positivo
24 interno). Ressalta-se que para a proteína BCL-2 o infiltrado linfocitário foi
25 utilizado como controle positivo, pois quando presente (n=73) se mostrou sempre
26 positivamente marcado (Figura 2).

27

28

29

30

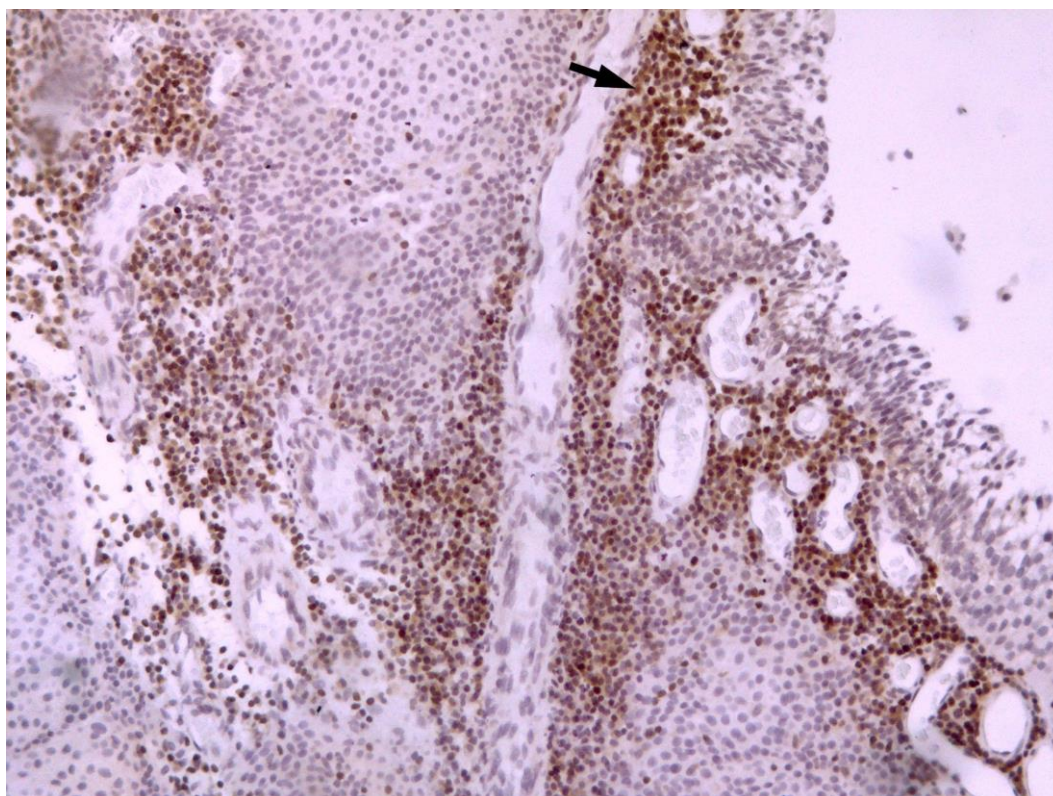
31

32

33

34

1 **Figura 2.** Imunomarcção positiva para a proteína BCL-2 em infiltrado linfocitário de amostra
2 tecidual maligna de paciente portador de CUB.



3
4 Legenda: Infiltrado linfocitário positivamente marcado para BCL-2 em amostra tecidual de CUB.
5 Aumento de 100x em microscópio em microscópio Leica, DM 2000.

6

7 **Análise estatística**

8 Com o intuito de avaliar diferenças entre médias de idades dos grupos
9 amostrais foi realizado o teste T-student. Objetivando averiguar associações
10 entre as imunomarcações de BCL-2 e γ -H2AX e os parâmetros prognósticos
11 (tempo da primeira recidiva, grau tumoral, estadiamento patológico e
12 imunohistoquímica de p53), clínicos (diabetes, hipertensão, medicamento de uso
13 contínuo e histórico familiar de câncer), de exposição ambiental (exposição
14 ocupacional, hábitos tabagista e etilista), os subgrupos amostrais (invasão
15 muscular e recidiva tumoral), idade, sexo e entre as proteínas, foi realizado o
16 teste do Qui-quadrado. Possíveis correlações entre as mesmas variáveis foram
17 analisadas pelo teste de correlação Tau-b de Kendall.

18 Todas as análises foram realizadas no *software IBM® SPSS® Statistics*
19 *for Windows*, versão 23.0.1 (IBM® Corp. Armonk N.Y. EUA), utilizando-se como
20 nível de significância o valor de 5%.

21

1 **Resultados**

2 **Caracterização da amostra**

3 A amostra foi composta majoritariamente por homens (73,8%) e por
4 indivíduos não fumantes (65,0%). A média de idade dos pacientes na amostra
5 total (n=80) foi de 69,43±10,99 anos. Ao categorizar os grupos em “invasivo”
6 (n=19) e “não invasivo” (n=61), as idades médias foram 71,79±9,34 e
7 68,69±11,43, respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente
8 significativa (p=0,286).

9 Em relação ao hábito tabagista, tanto no grupo “não invasivo” quanto no
10 grupo “invasivo” houve prevalência de indivíduos não fumantes, não havendo
11 associação do hábito tabagista (p=0,065), nem da idade com invasão muscular
12 (p=0,768) (Tabela 1).

13 Observou-se predominância de indivíduos não diabéticos (77,5%),
14 hipertensos (61,3%), com históricos de uso contínuo de medicamentos (67,5%)
15 e de câncer na família (55,0%), entretanto, estas variáveis também não foram
16 estatisticamente associadas aos parâmetros invasão muscular e recidiva tumoral
17 (Tabela 1). Não foi possível obter todos dados para a amostra completa, devido
18 às informações faltantes em questionários e prontuários médicos.

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 **Tabela 1.** Caracterização da amostra total em relação aos parâmetros socioculturais e de
 2 exposição ambiental e associação com invasão muscular.

	N	Amostra total (%)	n	Não invasivo (%)	n	Invasivo (%)	p	n	Sem recidiva (%)	n	Com recidiva (%)	p
Idade												
<65	20	25,0	16	80,0	4	20,0	0,768	7	35,0	13	65,0	0,691
≥ 65	60	75,0	45	75,0	15	25,0		24	40,0	36	60,0	
Sexo												
Mulher	21	26,2	16	76,2	4	23,8	1,000	5	23,8	16	76,2	0,123
Homem	59	73,8	45	76,3	15	23,7		26	44,1	33	55,9	
Tabagismo												
Não	52	65,0	43	82,7	9	17,3	0,065	21	40,4	31	59,6	0,683
Sim	28	35,0	18	64,3	10	35,7		10	35,7	18	64,3	
Ex-tabagismo												
Não	43	54,4	12	27,9	31	72,1	0,381	18	41,9	25	58,1	0,602
Sim	36	45,6	7	19,4	29	80,6		13	36,1	23	63,9	
Etilismo												
Não	6	42,9	4	66,7	2	33,3	1,000	4	66,7	2	33,3	0,091
Sim	8	57,1	5	62,5	3	37,5		1	12,5	7	87,5	
Exposição ocupacional												
Não	7	41,2	5	71,4	2	28,6	0,622	1	14,3	6	85,7	0,134
Sim	10	58,8	5	50,0	5	50,0		6	60,0	4	40,0	
Diabetes												
Não	62	81,3	48	77,4	14	22,6	0,721	24	38,7	38	61,3	0,553
Sim	14	18,7	12	85,7	2	14,3		4	28,6	10	71,4	
Hipertensão												
Não	27	35,5	19	70,4	8	29,6	0,259	9	33,3	18	66,7	0,638
Sim	49	64,5	40	81,6	9	22,2		19	38,8	30	61,2	
Medicamento de uso contínuo												
Não	23	29,9	17	73,9	6	26,1	0,714	6	26,1	17	73,9	0,221
Sim	54	70,1	42	77,8	12	22,2		22	40,7	32	59,3	
Histórico familiar de câncer												
Não	33	42,9	25	75,8	8	24,2	0,876	11	33,3	22	66,7	0,497
Sim	44	57,1	34	77,3	10	22,7		18	40,9	26	59,1	
Imunohistoquímica p53												
Marcação negativa	10	38,5	7	70,0	3	30,0	1,000	0	00,0	10	100,0	0,121
Marcação positiva	16	61,5	10	62,5	6	37,5		5	31,3	11	68,8	

3 Não foi possível obter dados de todos os parâmetros para a amostra completa. Os p valores são
 4 referentes aos testes de Qui-quadrado de exato de Fisher quando necessários.

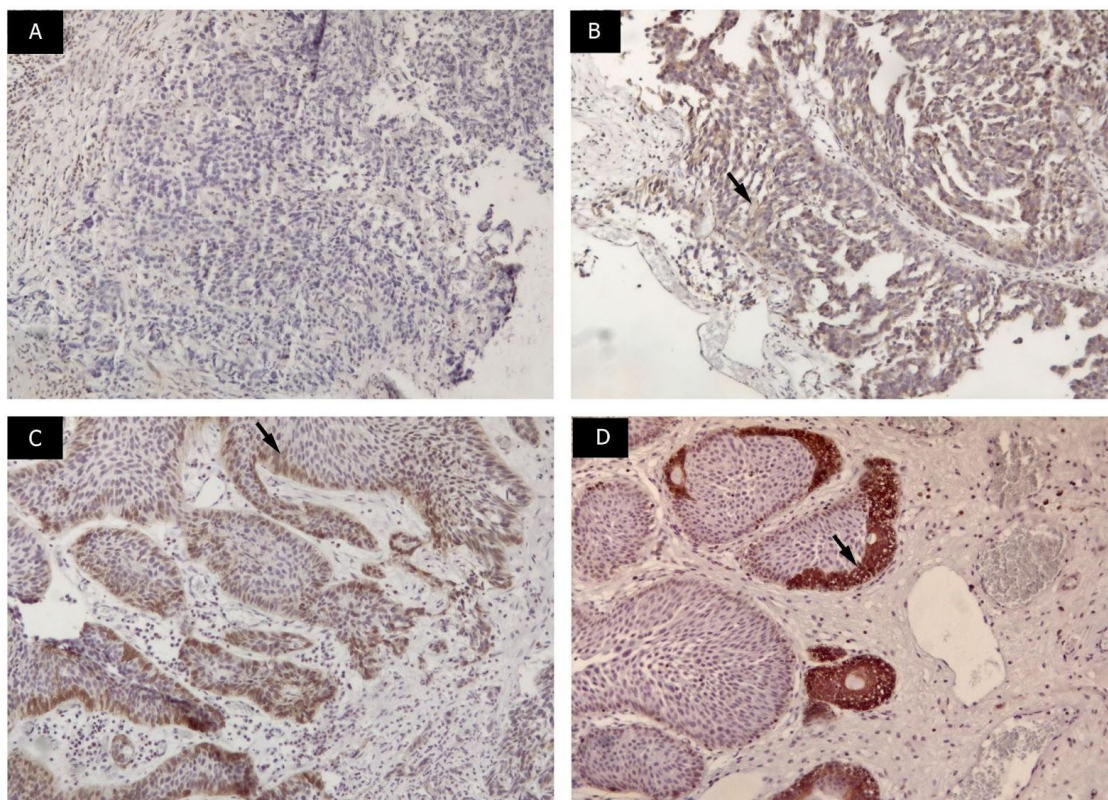
5 **Imunomarcção das proteínas**

6 A imunomarcção da proteína BCL-2 foi observada sempre no citoplasma
 7 das células tumorais, enquanto a da histona γ -H2AX ocorreu sempre no núcleo
 8 (Figuras 3 e 4), não sendo observadas expressões das respectivas proteínas em
 9 outras localizações celulares. Nas amostras não tumorais adjacentes, a
 10 imunomarcção de BCL-2 e γ -H2AX foram predominantemente fraca (+) ou
 11 ausente (-) (dados não mostrados).

1 No que se refere ao tecido tumoral maligno, na amostra total a BCL-2 se
2 mostrou não marcada em metade das amostras (n=40) (Figura 3). Já a
3 imunomarcção da histona γ -H2AX (Figura 4) apresentou predominantemente a
4 imunomarcção forte (+++) (41,7%).

5

6 **Figura 3.** Perfis de imunomarcção da proteína BCL-2 em amostras teciduais de pacientes
7 portadores de CUB.



8

9 Legenda: Perfis de imunomarcção da proteína BCL-2 em amostras teciduais de CUB pela
10 técnica de imunohistoquímica indireta. A) imunomarcção negativa para BCL-2. B)
11 imunomarcção fraca (+) para BCL-2. C) Imunomarcção forte (+++) para BCL-2. As setas
12 apontam as regiões de imunomarcção para a proteína BCL-2 em amostras teciduais malignas
13 de bexiga urinária. Aumento de 100x em microscópio em microscópio Leica, DM 2000.

14

15

16

17

18

19

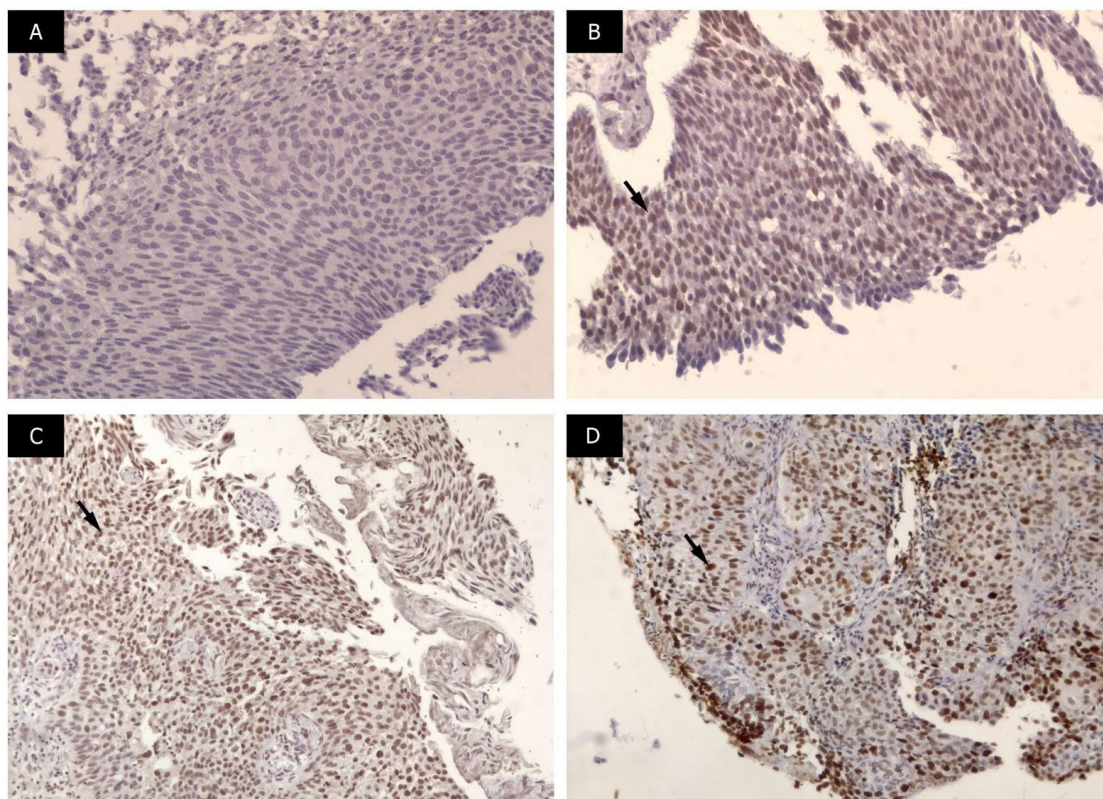
20

21

22

1

2 **Figura 4.** Perfis de imunomarcção da proteína γ -H2AX em amostras teciduais de pacientes
3 portadores de CUB.



4

5 Legenda: Perfis de imunomarcção da proteína γ -H2AX em amostras teciduais de CUB pela
6 técnica de imunohistoquímica indireta. A) imunomarcção negativa para γ -H2AX. B)
7 imunomarcção fraca (+) para γ -H2AX. C) Imunomarcção forte (+++) para γ -H2AX. As setas
8 apontam as regiões de imunomarcção para a proteína γ -H2AX em amostras teciduais malignas
9 de bexiga urinária. Aumento de 100x em microscópio em microscópio Leica, DM 2000.

10

11 Ao considerar a subclassificação amostral em relação à invasão da
12 camada muscular, observou-se que BCL-2 foi majoritariamente ausente em
13 ambos os grupos, enquanto γ -H2AX apresentou uma marcação forte no grupo
14 “invasivo” (52,6%) (Gráfico 1).

15

16

17

18

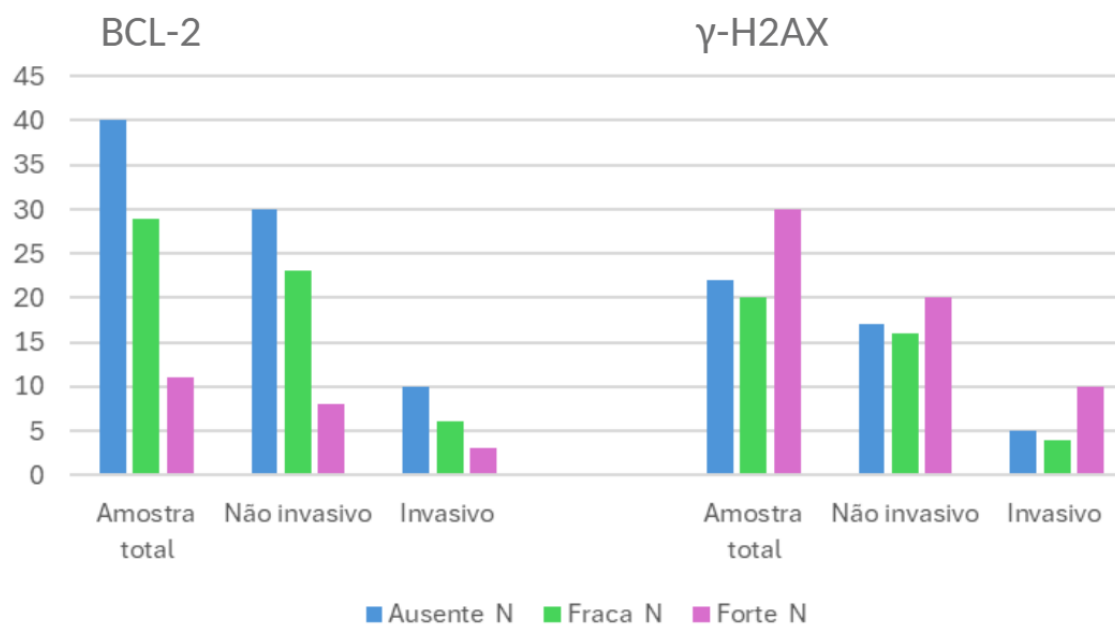
19

20

21

22

1 **Gráfico 1.** Número de pacientes portadores dos perfis ausente, fraco e forte de imunomarcção
 2 para as proteínas BCL-2 e γ -H2AX na amostra total e nos grupos “não invasivo” e “invasivo”.



3
 4 Legenda: Gráfico de distribuição dos perfis de imunomarcção de BCL-2 e γ -H2AX na amostra
 5 total e nos grupos “não invasivo” e “invasivo”.

6
 7 Adicionalmente, não houve associação significativa entre os subgrupos
 8 amostrais quando foi considerada a presença de recidiva tumoral em relação aos
 9 perfis de imunomarcção de BCL-2 ($p=0,652$) e γ -H2AX ($p=0,430$) (Tabelas 2 e
 10 3).

11 O teste Tau-b de Kendall revelou ausência de correlações significativas
 12 entre as imunomarcções de BCL-2 e γ -H2AX considerando: parâmetros
 13 prognósticos, grupos amostrais, fatores de risco ou proteínas entre si ($p =0,158$)
 14 (Tabelas 2 e 3).

15 A análise de tais variáveis pelos testes do Qui quadrado e Exato de Fisher
 16 também não demonstraram associações significativas com nenhum dos
 17 parâmetros (Tabelas 2 e 3).

18
 19
 20
 21
 22
 23
 24

1 **Tabela 2.** Análises de associação e correlação do perfil de imunomarcção da proteína BCL-2
 2 em relação aos parâmetros socioculturais, de exposição e prognósticos em pacientes portadores
 3 de CUB.

Parâmetros avaliados	Ausência de marcação (%)	Marcação fraca (%)	Marcação forte (%)	p ²	p valor de Kendall
Sexo					
Mulher	3 (42,9%)	7 (33,3%)	5 (23,8%)	0,293	0,258
Homem	31 (52,5%)	22 (37,3%)	5 (10,2%)		
Idade					
<65	11 (55,0%)	7 (35,0%)	2 (10,0%)	0,812	0,545
≥65	29 (48,3%)	22 (36,7%)	9 (15,0%)		
Diabetes					
Não	29 (46,8%)	23 (37,1%)	10 (16,1%)	0,555	0,213
Sim	9 (64,3%)	4 (28,6%)	1 (7,1%)		
Hábito tabagista					
Não	22 (42,3%)	22 (42,3%)	8 (15,4%)	0,169	0,085
Sim	18 (64,3%)	7 (25,0%)	3 (10,7%)		
Ex-tabagismo					
Não	21 (48,8%)	15 (34,9%)	7 (16,3%)	0,603	0,458
Sim	19 (52,8%)	14 (38,9%)	3 (8,3%)		
Hábito Etilista					
Não	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0 (00,0%)	0,467	1,000
Sim	4 (50,0%)	2 (25,0%)	2 (25,0%)		
Exposição ocupacional					
Não	4 (57,1%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)	0,078	1,000
Sim	4 (40,0%)	6 (60,0%)	0 (00,0%)		
Hipertensão					
Não	16 (59,3%)	8 (29,6%)	3 (11,1%)	0,391	0,188
Sim	21 (42,9%)	20 (40,8%)	7 (14,3%)		
Medicação de uso contínuo					
Não	12(52,2%)	8 (34,8%)	3 (13,0%)	0,946	0,741
Sim	26 (48,1%)	20 (37,0%)	7 (13,0%)		
Histórico familiar de câncer					
Não	19 (57,6%)	9 (27,3%)	5 (15,2%)	0,454	0,427
Sim	20 (45,5%)	18 (40,9%)	6 (13,6%)		
Imunohistoquímica p53					
Negativo	5 (50,0%)	3 (30,0%)	2 (20,0%)	0,757	0,954
Positivo	7 (43,8%)	7 (43,8%)	2 (12,5%)		
Grau					
Baixo	21(51,2%)	16 (39,0%)	4 (9,8%)	0,536	0,518
Alto	18 (47,4%)	13 (34,2%)	7 (18,4%)		
Estadiamento patológico					
pTa	16 (50,0%)	14 (43,8%)	2 (06,3%)	0,488	0,812
pT1	10 (47,6%)	8 (38,1%)	3 (14,3%)		
≥pT2	11 (55,0%)	5 (25,0%)	4 (20,0%)		
Invasão					

	Não	30 (49,2%)	23 (37,7%)	8 (13,1%)	0,878	0,906
	Sim	10 (52,6%)	6 (31,6%)	3 (15,8%)		
Recidiva	Não	17 (54,8%)	11 (35,5%)	3 (09,7%)	0,652	0,402
	Sim	23 (46,9%)	18 (36,7%)	8 (16,3%)		
N° recidiva	0	17 (54,8%)	11 (35,5%)	3 (09,7%)	0,877	0,539
	1	12 (46,2%)	9 (34,6%)	5 (19,2%)		
	>1	11 (47,8%)	9 (39,1%)	3 (13,0%)		
tempo da primeira recidiva	0	16 (54,8%)	11 (35,5%)	3 (09,7%)	0,778	0,883
Até seis meses	8 (38,1%)	9 (42,9%)	4 (19,0%)			
Até 1 ano	9 (64,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)			
Até 5 anos	7 (46,7%)	6 (40,0%)	2 (13,3%)			
Grupos amostrais	Invasivo	10 (52,6%)	6 (31,6%)	3 (15,8%)	0,987	0,891
Não invasivo sem recidiva	13 (54,2%)	8 (33,3%)	3 (12,5%)			
Não invasivo 1 recidiva	8 (44,2%)	7 (38,9%)	3 (16,7%)			
Não invasivo +1 recidiva	9 (47,4 %)	8 (42,1%)	2 (10,5%)			

1 Resultados obtidos pelos testes de Qui-quadrado, exato de Fisher e Tau-b de Kendall com nível
2 de significância fixado em 5%

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

1 **Tabela 3.** Análises de associação e correlação do perfil de imunomarcacão da proteína γ -H2AX
 2 em relação aos parâmetros socioculturais, de exposicão e prognósticos em pacientes portadores
 3 de CUB.

Parâmetros avaliados	Ausência de marcação (%)	Marcação fraca (%)	Marcação forte (%)	p ²	p valor de Kendall
Sexo					
Mulher	6 (31,6%)	2 (10,5%)	11 (57,9%)	0,110	0,320
Homem	16 (30,2%)	18 (34,0%)	19 (35,8%)		
Idade					
<65	5 (27,8%)	5 (27,8%)	8 (44,4%)	0,949	0,750
≥65	17 (31,5%)	15 (27,8%)	22 (40,7%)		
Diabetes					
Não	15 (27,8%)	13 (24,1%)	26 (48,1%)	0,223	0,096
Sim	6 (42,9%)	5 (35,7%)	3 (21,4%)		
Hábito tabagista					
Não	13 (27,7%)	12 (25,5%)	22 (46,8%)	0,478	0,261
Sim	9 (36,0%)	8 (32,0%)	8 (32,0%)		
Ex-tabagismo					
Não	11 (27,5%)	9 (22,5%)	20 (50,0%)	0,320	0,211
Sim	11 (35,5%)	10 (32,3%)	10 (32,3%)		
Hábito Etilista					
Não	1 (25,0%)	1 (25,0%)	2 (50,0%)	0,714	0,502
Sim	3 (60,0%)	0 (0,00%)	2 (40,0%)		
Exposicão ocupacional					
Não	2 (66,7%)	0 (0,00%)	1 (33,3%)	0,709	0,434
Sim	2 (22,2%)	4 (44,4%)	3 (33,3%)		
Hipertensão					
Não	7 (31,8%)	5 (22,7%)	10 (45,5%)	0,956	0,966
Sim	14 (30,4%)	12 (26,1%)	20 (43,5%)		
Medicacão de uso contínuo					
Não	9 (45,0%)	4 (20,0%)	7 (35,0%)	0,243	0,167
Sim	12 (24,5%)	14 (28,6%)	23 (46,9%)		
Histórico familiar de câncer					

	Não	8 (27,6%)	9 (31,0%)	12 (41,4%)	0,577	0,896
	Sim	14 (35,0%)	8 (20,0%)	18 (45,0%)		
Imunohistoquímica p53	Negativo	2 (25,0%)	4 (50,0%)	2 (25,0%)	0,419	0,681
	Positivo	7 (46,7%)	3 (20,0%)	5 (33,3%)		
Grau	Baixo	7 (20,0%)	12 (34,3%)	16 (45,7%)	0,197	0,224
	Alto	14 (38,9%)	8 (22,2%)	14 (38,9%)		
Estadiamento patológico	pTa	6 (21,4%)	9 (32,1%)	13 (46,4%)		
	pT1	10 (50,0%)	5 (25,0%)	5 (25,0%)	0,188	0,911
	≥pT2	4 (21,1%)	5 (26,3%)	10 (52,6%)		
Invasão	Não	17 (32,1%)	16 (30,2%)	20 (37,7%)		
	Sim	5 (26,3%)	4 (21,1%)	10 (52,6%)	0,518	0,347
Recidiva	Não	7 (22,6%)	10 (32,3%)	14 (45,2%)		
	Sim	15 (36,6%)	10 (24,4%)	16 (39,0%)	0,430	0,338
N° recidiva	0	7 (22,6%)	10 (32,3%)	14 (45,2%)		
	1	8 (33,3%)	6 (25,0%)	10 (41,7%)	0,737	0,279
	>1	7 (41,2%)	4 (23,5%)	6 (35,3%)		
tempo da primeira recidiva	0	7 (23,3%)	10 (33,3%)	13 (43,3%)		
	Até seis meses	9 (52,9%)	4 (23,5%)	4 (23,5%)	0,052	0,905
	Até 1 ano	1 (09,1%)	1 (09,1%)	9 (81,8%)		
	Até 5 anos	5 (35,7%)	5 (35,7%)	4 (28,6%)		
Grupos amostrais	Invasivo	5 (26,3%)	4 (21,1%)	10 (52,6%)		
	Não invasivo sem recidiva	6 (25,00%)	8 (33,3%)	10 (41,7%)		
	Não invasivo 1 recidiva	5 (31,3%)	5 (31,3%)	6 (37,5%)	0,822	0,918
	Não invasivo +1 recidiva	6 (46,2%)	3 (23,1%)	4 (30,8%)		

1 Resultados obtidos pelos testes de Qui-quadrado, exato de Fisher e Tau-b de Kendall com nível
2 de significância fixado em 5%

3

4 **Discussão**

5 O presente estudo avaliou as proteínas BCL-2 e γ -H2AX como possíveis
6 candidatas a marcadores em amostras teciduais de pacientes com CUB e obteve
7 como resultados principais: ausência de marcação para a proteína antiapoptótica
8 BCL-2 em metade das amostras e predominância de perfil forte da proteína de
9 sinalização de danos de dupla fita de DNA γ -H2AX, com ausência de associação

1 significativa para ambas as proteínas em relação a parâmetros prognósticos e
2 fatores de risco (idade, sexo e exposição ambiental). Quando foram
3 considerados subgrupos amostrais baseados em invasão a camada muscular e
4 recidiva tumoral, também não foram observadas associações significativas. Até
5 o momento, não encontramos dados na literatura que tenham investigado a
6 imunomarcção de γ -H2AX em relação aos parâmetros grau tumoral,
7 estadiamento patológico e tempo decorrido entre o tumor primário e a primeira
8 recidiva em amostras de CUB, sendo este trabalho pioneiro na investigação
9 destes indicadores prognósticos.

10 A presente amostra foi composta na sua maioria por indivíduos do sexo
11 masculino e com média de idade superior a 65 anos de idade, o que corrobora
12 com dados prévios da literatura (MA et.al., 2023). Além disso, a idade não foi
13 associada à recorrência tumoral, entretanto em estudo realizado por Lobo et al.
14 (2024) a partir de informações de indivíduos acometidos por CUB não invasivo
15 depositadas em bancos de dados foi identificada uma associação significativa
16 entre idade superior a 81 anos e recidiva tumoral.

17 Apesar do tabagismo ser um fator de risco reconhecido para o CUB
18 (WOJTCZYK-MIASKOWSKA & SCHLICHTHOLZ, 2019), a frequência de
19 indivíduos fumantes foi baixa neste estudo, sendo cerca de três vezes menor do
20 que a descrita nos estudos de Tanabe et al. (2023) e Nasr et al. (2023). Não
21 foram observadas associações significativas entre a invasão muscular em
22 relação ao tabagismo, o que pode ser uma consequência do reduzido número
23 de pacientes com esta característica.

24 Além disso, o presente trabalho não observou resultados significativos
25 entre a imunomarcção de BCL-2 e o hábito tabagista. Daryanto et al. (2022)
26 identificou diferença significativa na expressão deste fator antiapoptótico em
27 grupos de ratos Wistar expostos e não expostos ao cigarro, indicando que este
28 tipo de exposição ambiental pode induzir um aumento da expressão de BCL-2,
29 auxiliando na tumorigênese de bexiga. Pourebrahimi et al. (2022) não
30 observaram associação significativa entre idade e expressão da BCL-2, mas
31 observaram que a imunomarcção desta proteína foi significativamente maior
32 em mulheres. Cheung et al. (2009) também não encontraram associação
33 significativa entre a expressão de γ -H2AX e a idade. O presente trabalho
34 corrobora com estes estudos, pois não foram identificadas associações ou

1 correlações significativas entre a imunomarcção de ambas as proteínas e a
2 idade dos pacientes.

3 Segundo o “*The Human Protein Atlas*”, para dados obtidos de 11 amostras
4 de pacientes com CUB, a expressão de BCL-2 é ausente, enquanto γ -H2AX
5 encontra-se expressa nestes tumores malignos, de maneira que os resultados
6 do presente estudo estão de acordo com os depositados. Ainda segundo este
7 banco de dados, ambas as proteínas apresentam baixa especificidade tecidual,
8 além de apresentarem imunomarcção de intensidade intermediária em tecido
9 normal de bexiga urinária. No presente estudo, foram observadas marcações
10 fracas ou ausentes nas amostras não tumorais adjacentes avaliadas, o que pode
11 refletir o fato dos tecidos adjacentes não serem considerados biologicamente
12 normais nem malignos, podendo já apresentar um perfil tecidual distinto.

13 Adicionalmente, os resultados corroboram os descritos por Goyal et al.
14 (2014), Jahed et al. (2016) e Mostafae et al. (2021), Pourebrahimi et al. (2022)
15 que também utilizaram a metodologia de IHQ e não observaram correlações
16 significativas entre a imunomarcção de BCL-2 e os parâmetros de
17 estadiamento patológico e grau tumoral. Ressalta-se que o tamanho amostral
18 destes estudos foi similar ao do presente trabalho (n=71 amostras), com exceção
19 do último estudo (n=30 amostras), o que pode indicar que de fato a expressão
20 de BCL-2, proteína de inibição da apoptose, não estaria associada a estes
21 indicadores prognósticos em CUB. Já Basnihar et al. (2013) identificaram
22 associação significativa desta mesma proteína com estadiamento patológico em
23 amostra de 84 pacientes.

24 Estudos realizados pelo Instituto Nacional de Ciências da Saúde, no
25 Japão, avaliaram camundongos expostos a compostos genotóxicos e
26 carcinogênicos como Beta-benzilaminonorepinefrina (BBN), ácido 2-
27 nitrobenzóico (2-NA), Fenetil Isotiocianato (PEITC), uracil, melamine (YAMADA
28 et al., 2020) e 1-amino-2,4-dibromoanthraquinone (ADBAQ), fenacetina (PNC),
29 N-nitrosodifenilamina (NDPA), o-fenilfenato de sódio (SOPP) e ácido 11-
30 aminoundecanóico (AUDA) (SUZUKI et al., 2020). Após o tratamento, os tecidos
31 de bexiga foram analisados por IHQ, revelando aumento de marcação da γ -
32 H2AX nas células uroteliais dos animais, assim como a presença de hiperplasia
33 urotelial e infiltrado linfocitário. Desta forma, os autores concluíram que o
34 aumento na expressão desta proteína poderia estar relacionado com o início do

1 processo da carcinogênese de bexiga, sugerindo seu uso para detecção precoce
2 de CUB em indivíduos expostos a compostos carcinogênicos e genotóxicos.

3 No câncer de mama, o aumento na expressão da histona γ -H2AX foi
4 associado a alto grau, tumor com tamanho elevado e comprometimento
5 linfonodal (VARVARA et al. 2019), bem como a um pior prognóstico em subtipo
6 triplo negativo (NAGELKERKE et al. 2015). Em câncer de ovário, por outro lado,
7 sua elevada expressão foi indicativa de melhor sobrevivência (SARAVI et 2020).
8 Assim, a literatura mostra a importância da γ -H2AX como biomarcador em
9 diferentes modelos tumorais, podendo indicar bom ou mau prognóstico,
10 destacando resultados conflitantes. Apesar disso, não observamos correlações
11 significativas entre os parâmetros prognósticos e a imunomarcagem de γ -H2AX.

12 No presente estudo, objetivou-se ainda comparar e dividir a amostra
13 quanto à invasão da camada muscular e presença de recidivas tumorais, para
14 verificar se as proteínas investigadas poderiam ter alguma influência sobre estes
15 eventos, porém não foram observados resultados significativos. Basniper et al.
16 (2013) identificaram associação positiva entre imunomarcagem de BCL-2 e
17 invasão muscular, constatando uma imunomarcagem positiva mais frequente nos
18 tumores invasivos, e sugerindo que a presença da BCL-2 no microambiente
19 tumoral estaria associada a maior risco de invasão muscular. Em relação às
20 recidivas tumorais, a literatura não apresenta associações significativas
21 considerando-se a proteína BCL-2 (AJILI et al. 2012). Uma correlação negativa
22 entre recidiva tumoral e imunomarcagem de γ -H2AX foi observada por Cheung
23 et al. (2009) em 60 pacientes acometidos por CUB não invasivo de baixo grau.
24 Porém, em nosso estudo, esta proteína não se mostrou diretamente relacionada
25 com invasão tecidual ou reincidência tumoral.

26

27 **Conclusão**

28 Os resultados do presente estudo indicam que as proteínas BCL-2 e γ -
29 H2AX, apesar de possuírem expressão no tecido tumoral maligno, e em
30 intensidades distintas, não se mostraram marcadores eficazes de prognóstico.
31 Este estudo foi pioneiro na investigação do perfil de imunomarcagem de γ -H2AX
32 em relação aos parâmetros prognósticos grau tumoral, tempo decorrido entre a
33 o tumor primário e a primeira recidiva, bem como em relação ao estadiamento

1 patológico, e demonstrou que ambas as proteínas parecem não estar
2 diretamente envolvidas nos processos de invasão tecidual ou reincidência
3 tumoral maligna da bexiga.

4

5 **Referências**

6 AJILI, F; KAABI, B; DAROUICHE, A; TOUNSI, H; KOURDA, N; CHEBIL, M;
7 MANAI, M; BOUBAKER, S; Prognostic value of bcl-2 and bax tumor cell
8 expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus
9 calmette-guerin immunotherapy, **Ultrastructural Pathology**, Tunísia, vol. 36, n. 1,
10 p. 31-39, 2012, DOI 10.3109/0193123.2011.620221.

11 BASNIPAR, S; BIRCAN, S; YAVUZ, G; KAPUCUOGLU, Beclin 1 and bc-2
12 expressions in bladder urothelial tumors and their association with
13 clicopathological parameters, **Pathology - Research and Practice**, Turquia, vol.
14 209, n. 7, p. 418-423, abr./jul. 2013, DOI 10.1016/j.prp.2013.04.006.

15 CHEUNG, W. L; ALBADINE, R; CHAN, T; SHARMA, R; NETTO, G. J;
16 Phosphorylated H2AX in noninvasive low grade urothelial carcinoma of the
17 bladder: correlation with tumor recurrence, **The Journal of Urology**, Estados
18 Unidos, vol. 181, p. 1387-1392, mar. 2009, DOI 10.1016/j.juro.2008.10.146.

19 DARYANTO, B; WIBOWO, E; SEPUTRA, K. P; YUDHANTO, H. S; Effect of
20 conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on expression of B-Cell
21 Lymphoma-2 (BCL-2) in the bladder epithelium of Wistar (Rattus norvegicus) rats
22 exposed to cigarette smoke, **Medical Archives**, vol. 75, n. 5, p. 343-347, oct.
23 2022, DOI 10.5455/medarh.2022.76.343-347.

24 GLOBOCAN – The Global Cancer Observatory, **World Health Organization**,
25 Estimated number of new cases from 2020 to 2025, incidence, both sex, age, [0-
26 +85], Bladder, França, disponível em: [Cancer Tomorrow \(iarc.fr\)](https://gco.iarc.fr), acesso em 05
27 mar 2024.

28 GOYAL, S; SINGH, U. R; SHARMA, S; KAUT, N; Correlation of mitotic indices
29 AgNor count, ki-67, bcl-2 with grade and stage in papillary urothelial bladder
30 cancer, **Urology oncology**, Índia, vol. 11, n. 01, p. 1238–1247, 2014.

31 GUO, R; WANG, L; BAI, S; KANG, D; ZHANG, W; DING, Z; XING, T; HAO, M;
32 LIANG, Y; JIAO, B; ZHANG, G; YING, L; CHEN, R; CHEN, X; ZHANG, W;
33 WANG, J; WAN, C; YU, C; WANG, H; YANG, Z; Specific subsets of urothelial

- 1 bladder carcinoma infiltrating T cells associated with poor prognosis, *Nature*,
2 China, vol. 13. n. 12801, p. 1-17, abr./jul. 2023, DOI 10.1038/s41598-023-39208-
3 0.
- 4 HANAHAN, D; Hallmarks of cancer: new dimensions, **Cancer Discovery**, Suíça,
5 vol. 12, n. 1, p. 31-46, nov. 2021/ jan. 2022, DOI 10.1158/2159-8290.CD-21-
6 1059.
- 7 JAHED, M; EBADI, N; MIVEHCHI, M; MAJIDIZADEH, T; SHAHSHANIPOUR, M;
8 ASGARI, M; GHADAKZADEH, S; HOSSEINI, S. A; MGMT hypermethylation and
9 BCL-2 overexpression associated with superficial bladder cancer and recurrence,
10 **Cancer Biomarkers**, Irã, vol. 16, 2016 DOI 10.3233/CBM=160604.
- 11 KRAJEWSKI, S; TANAKA, S; TAKAYAMA, S; SCHIBLER, M. J; FENTON, W;
12 REED, C. J; Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein:
13 residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer
14 mitochondrial membranes, **Cancer Research**, Estados Unidos, vol. 53, n. 19, p.
15 4701-4714, jul./oct. 1993.
- 16 LOBO, N; DUAN, Z; SOOD, A; TAN, W. S; GRAJALES, V; CANTIERI, R;
17 LINDSKROG, S. V; DYRSKJØT, L; ZHAO, H; GIORDANO, S, H; WILLIAMS, S.
18 B; BREE, K. K; KAMAT, A. M; Association of age with non-muscle-invasive
19 bladder cancer: unearthing a biological basis for epidemiological disparities?,
20 **European Association of Urology**, Reino Unido, dez. 2023/ jan. 2024, DOI
21 10.1016/j.euo.2024.01.011
- 22 MA, G; JIA, H; ZHANG, G; LIANG, Y; DONG, X; FU, GUANGMING, WANG, X;
23 NIU, H; Presence, subtypes, and prognostic significance of tertiary lymphoid
24 structures in urothelial carcinoma of the bladder, **The Oncologist**, China, out.
25 2023, DOI 10.1093/oncology/oyad283.
- 26 MATSUDA, Y, WAKAI, T; KUBOTA, M; OSAWA, M; TAKAMURA, M;
27 YAMAGIWA, S; AOYAGI, Y; SANPEI, A; FUJIMAKI, S; DNA damage sensor γ -
28 H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma, **The**
29 **Scientific World Journal**, Japão, vol. 2013, n. 597095, p.1-7, fev. 2013, DOI
30 10.1155/2013/597095.
- 31 MIKHAILOV, V; MIKHAILOVA, M; PULKRABEK, D. J; DONG, Z;
32 VENKATACHALAM, M. A; SAIKUMAR, P; Bcl-2 prevents Bax oligomerization in
33 the mitochondrial outer membrane, **The Journal of Biological Chemistry**,

- 1 Estados Unidos, vol. 276, n. 21, p. 18361-18374, fev./mai. 2001, DOI
2 10.1074/jbc.M100655200.
- 3 MOSTAFAEE, N; SHEIKHPOUR, E; AKHAVAN, M; DANESHMAND, F,
4 HASHEMI, A; Immunohistochemical expression of BCL-2 and epidermal growth
5 factor receptor (EGFR) biomarkers in urothelial carcinoma of the bladder lesions,
6 **Ethiopian Medical Journal**, Irã, vol. 59, n. 3. p. 229-233, fev./jun. 2021.
- 7 NASR, S; HADDAD, F. G; KHAZEN, J; KATTAN, J; TRAK-SMAYRA, V; PDL1
8 protein expression by combined positive score (CPS) in patients with muscle
9 invasive or advanced urothelial carcinoma a single institution experience, BMC
10 Cancer, Líbano, vol. 23, n. 817, p. 1-6, jul./set. 2023, DOI
11 doi.org/10.1186/s12885-023-11299-y
- 12 NAGELKERKE, A; VAN KUJIK, S; MARTENS, J; SWEEP, C. G. F;
13 HOOGERBRUGGE, N; BUSSINK, J. SPAN, P. N; Poor prognosis of constitutive
14 γ -H2AX expressing triple-negative breast cancers is associated with telomere
15 length. **Biomarkers in medicine**, Países Baixos, v. 9, n. 4, p. 383-390, mar. 2015
16 DOI 10.2217/bmm.15.2.
- 17 PEREIRA, E. R; PINHEIRO, L. C. L; FRANCELINO, A. L; MIQUELOTO, C. A;
18 GUEMBAROVSKI, A. F. M. L; DE OLIVEIRA, K. B; FUGANTI, P. E; CÓLUS, I.
19 M. S; GUEMBAROVSKI, R. L; Tissue immunostaining of candidate prognostic
20 proteins in metastatic and non-metastatic prostate cancer, **Journal of Cancer**
21 **Research and Clinical Oncology**, Brasil, p. 1-11, ago 2022, DOI
22 10.1007/s00432-022-04274-w.
- 23 POUREBRAHIMI, E; TABRIZ, H. M; YAZDI, S. A. M; NAZAR, E; BATMANI, S;
24 The value of BCL-2 and CK20 expression in predicting behavioral patterns of
25 bladder cancer, a cross sectional study, **Annals, of medicine and Sugery**, Irã,
26 vol. 81, n. 104372, p.1-4, ago. 2022, DOI 10.1016/j.amsu.2022.104372.
- 27 POWLES, T; BELLMUNT, J; COMPERAT, E; HUDDART, R; LORIOT, Y;
28 NECCHI, A; VALDERRAMA, B. P; RAVAUD, A; SHARIAT, S. F; SAZABADOS,
29 B; VAN DER HEIJEN, M. S; GILLESSEN S; Bladder cancer: ESMO clinical
30 practice guideline for diagnosis treatment and follow-up, **Annals of Oncology**,
31 vol. 33, n. 3, p. 244-258, 2022, DOI 10.1016/j.annonc.2021.11.012.
- 32 RADKIEWICZ, C; EDGREN, G; JOHANSSON, A. L. V; JAHNSON, S;
33 HÄGGSTRÖM, C; AKRE, O; LAMBE, M; DICKMAN, P. W; Sex differences in

1 urothelial bladder cancer survival, **Clinical Genitourinary Cancer**, Suécia, vol.
2 18, n. 1, oct. 2019/fev. 2020, DOI 10.1016/j.clgc.2019.10.020.

3 REZAEIAN, A. H; LI, C; WU, C; ZHANG, X; DELACERDA, J; YPU, M. J; HAN, F;
4 CAI, Z; JEONG, Y. S; JIN, G; PHAN, L; CHOU, P; LEE, M; HUNG, M;
5 SARBASSOV, D; LIN, H; A hypoxia-responsive TRAF6-ATM-H2AX signalling
6 axis promotes HIF1 α activation, tumorigenesis and metastasis, **Nature Cell**
7 **Biology**, Estados Unidos, vol. 19, n. 1, p. 38-51, oct./dez. 2016, DOI
8 10.1038/ncb3445.

9 ROGAKOU, E. P; PILCH, D. R; ORR, A. H; IVANOVA, V. S; BONNER, W. M;
10 Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*,
11 **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, vol. 273, n. 10, p. 5858-
12 5868, mar. 1998, DOI 10.1074/jbc.273.10.5858.

13 SARAVI, S; KTSUTA, E; JEYANEETHI, J; AMIN, H. A; KASPAR, M; TAKABE,
14 K; PADOS, G; DRENOS, F; HALL, M; KARTERIS, H2A histone family member x
15 (H2AX) is upregulated in ovarian cancer and demonstrates utility as a prognostic
16 biomarker in terms of overall survival, **Journal of Clinical Medicine**, Inglaterra,
17 vol. 9, n. 2844, p. 1-14, ago./set. 2020, DOI 10.3990/jcm9092844.

18 SCHENDEL, S. L; XIE, Z; MONTAL, O. M; MATSUYAMA, S; MONTAL, M;
19 REED, J. C; Channel formation by antiapoptotic protein BCL-2, **Proceedings of**
20 **the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 94,
21 n. 10, p. 5113-5118, 1997.

22 SMITH, A. B; JAEGER, B; PINHEIRO, L. C; EDWARDS, L. J; TAN, H; NIELSEN,
23 M. E; REEVE, B. B; The impact of bladder cancer on health-related quality of life,
24 **Urological Oncology**, Estados Unidos, vol. 121, n. 4, p. 549-557, 2018, DOI
25 10.1111/bju.14047.

26 SUZUKI, S; GI, M; TOYODA, T; KATO, H; NAIKI-ITO, A; KAKEHASHI, A;
27 OGAWA, K; TAKAHASHI, S; WANIBUCHI, H; Role of γ -H2AX as a biomarker for
28 detection of bladder carcinogens in F344 rats, **Journal of toxicologic**
29 **Pathology**, Japão, vol. 33, n. 4, p. 279-285, jul./ago. 2020, DOI
30 10.1293/tox.2020-0038.

31 SYLVESTER, R. J; VAN DER MEIJDEN, P. M. A; OOSTERLINCK, W; WITJES,
32 J. A; BOUFFIOUX, C; DENIS, L; NEWLING, D. W. W; KURTH, K; Predicting
33 recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer
34 using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven

- 1 EORTC trials, **European Association of Urology**, Países Baixos, vol. 46, p.
2 466-477, Dez. 2005/ jan. 2006, DOI 10.1016/j.eururo.2005.12.031.
- 3 TANABE, K; NAKANISHI, Y; OKUBO, N; MATSUMOTO, S; UMINO, Y;
4 KATAOKA, M; YAJIMA, S; YOSHIDA, T; MIYAZAKI, S; KAWATA, T; ISHII, G;
5 WATANABE, R; MASUDA, H; Prevalence and characteristics of patients with
6 upper urinary tract urothelial carcinoma having potential Lynch syndrome
7 identified by immunohistochemical universal screening and Amsterdam criteria
8 II, **BMC Cancer**, Japão, vol. 23, n. 940, jul./set. 2023, DOI 10.1186/s12885-023-
9 11460-7.
- 10 The Human Protein Atlas, BCL2 pathology, disponível em:
11 <https://proteinatlas.org/ENSG00000171791-BCL2/pathology>, acesso em: 25 de
12 outubro 2023
- 13 The Human Protein Atlas, H2AX pathology, disponível em:
14 <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000188486-H2AX/pathology>, acesso em:
15 25 de outubro 2023
- 16 VARVARA, P. V; KARAOLANIS, G; VALAVANIS, C; STANC, G; TZAIDA, O;
17 TRIHIA, H; PATAPIS, P; DIMITROULIS, D; PERREA, D; gamma-H2AX: a
18 potential biomarker in breast cancer, **Tumor Biology**, Alemanha, vol. 41, n. 9, p.
19 1-7, ago./set. 2019, DOI 10.1177/1010428319878536.
- 20 YAMADA, T; TOYODA, T; MATSUSHITA, K; CHO, Y; AKAGI, J; MORIKAWA, T;
21 MIZUTA, Y; OGAWA, K; Expression of stem cell markers as useful
22 complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by
23 immunohistochemistry for γ -H2AX, **Archives of toxicology**, Japão, vol. 95, n. 2,
24 p. 715-726, nov. 2020, DOI 10.1007/s00204-020-02950-9.
- 25 WANG, Q; GAO, F; MAY, W. S; ZHANG, Y; FLAGG, T; DENG, X; Bcl2 negatively
26 regulates DNA double-strand break repair through a non-homologous end joining
27 pathway, **Molecular Cell**, Vol. 29, n. 4, p. 488-498, fev. 2008, DOI
28 10.1016/j.molcel.2007.12.029.
- 29 WOJTCZYK-MIASKOWSKA, A; SCHLICHTHOLZ, B; Tobacco carcinogens and
30 the methionine metabolism in human bladder cancer, **Mutation Research -**
31 **Reviews in Mutation Research**, Polônia, vol. 178, n. 108281, jun./jul. 2019, DOI
32 10.1016/j.mrrev.2019.06.001.
- 33
34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral "invasivo".

	BCL-2			γ H2AX		
	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário
BX105	x	-	x	x	+	x
BX142	x	-	x	x	-	x
BX147	x	+	+	x	++	x
BX155	x	+	x	x	+	+
BX156	x	++	+++	x	++	+
BX159	x	++	+	x	++	-
BX183	x	+	++	x	-	++
BX190	x	-	++	x	-	++
BX194	x	-	++	x	++	++
BX213	x	-	+	x	++	x
BX216	x	-	+	-	-	x
BX222	-	-	+	-	++	+
BX238	x	-	+	-	+++	x
BX278	x	-	+	-	+	+
BX288	-	-	x	-	+	+
BX325	x	-	+	x	++	x
BX331	x	+	++	x	++	x
BX332	x	++	+	x	-	x
BX342	x	+	++	x	++	x

Legenda: x indica a ausência do tecido tumoral adjacente ou do infiltrado linfocitário, - indica ausência de imunomarcacão, + indica imunomarcacão fraca, ++ imunomarcacão intermediária e +++ imunomarcacão forte.

1
2
3
4

Tabela 2. Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “não invasivo sem recidiva”.

	BCL-2			γ H2AX		
	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário
BX08	x	+	+	x	+	+
BX148	x	-	x	x	-	+
BX151	x	-	++	x	+	x
BX160	x	+	+	x	+	-
BX165	x	+	++	x	+	++
BX203	x	-	+	x	-	+
BX206	+	-	++	x	-	+
BX215	x	++	++	x	++	+
BX225	x	+	++	x	++	+
BX240	x	-	++	++	+	++
BX241	x	++	++	x	++	-
BX244	x	-	+	x	-	-
BX245	x	++	+	x	-	-
BX248	x	-	++	x	-	++
BX250	x	-	+	x	++	+
BX257	x	-	++	x	++	-
BX258	x	+	+++	x	++	-
BX265	x	-	+	x	++	+
BX285	x	-	+	x	++	-
BX293	x	+	++	x	++	++
BX295	x	+	++	x	+	-
BX314	x	-	++	x	++	-
BX315	x	-	++	x	-	+
BX317	x	+	++	x	+	-

5 Legenda: x indica a ausência do tecido tumoral adjacente ou do infiltrado linfocitário, - indica
6 ausência de imunomarcação, + indica imunomarcação fraca, ++ imunomarcação intermediária e
7 +++ imunomarcação forte.

8
9
10
11
12
13

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Tabela 3. Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “não invasivo com uma recidiva”

	BCL-2			γ H2AX		
	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário
BX146	x	+	++	x	++	+
BX170	x	+	+	x	+	+
BX176	x	-	+++	x	+	+
BX177	x	-	+++	x	++	-
BX178	x	+	++	x	+	+
BX181	x	+	++	x	+	-
BX185	x	-	+	x	-	-
BX187	x	-	x	x	++	-
BX188	x	+++	x	x	++	+
BX193	x	-	x	x		
BX196	x	-	x	x	+	++
BX204	x	-	++	x	-	-
BX210	x	++	++	x	-	+
BX242	x	+	+	x	-	-
BX249			x	x	-	-
BX259	x	+	++	x	++	+
BX296	x	++	++	x	++	+
BX312	x	+	+	x	-	-

Legenda: x indica a ausência do tecido tumoral adjacente ou do infiltrado linfocitário, - indica ausência de imunomarcação, + indica imunomarcação fraca, ++ imunomarcação intermediária e +++ imunomarcação forte.

1
2
3
4
5**Tabela 4.** Imunomarcações de proteínas BCL-2 e γ -H2AX no grupo amostral “não invasivo com mais de uma recidiva”.

	BCL-2			γ H2AX		
	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário	Tecido não tumoral adjacente	Tecido tumoral	Infiltrado linfocitário
BX153	x	-	+	x	++	-
BX154	x	+	x	x	-	-
BX158						
BX166	x	-	++	x	-	++
BX171	x	+	+++	x	-	+
BX175	x	-	+	x	++	+
BX186	x	+	+	x	+++	++
BX198	x	++	+	x	+	-
BX205	x	-	+	x	-	-
BX207	x	+	++	x	-	++
BX254	x	+	++	x	-	-
BX276	+	+	++	-	++	++
BX277	x	-	++	x	+	-
BX283	x	-	++	x	+	+
BX322	x	-	++			
BX323	x	-	+++			
BX327	x	++	++			
BX328	x	-	x			
BX339	x	+	++			

6
7
8
9
Legenda: x indica a ausência do tecido tumoral adjacente ou do infiltrado linfocitário, - indica ausência de imunomarcação, + indica imunomarcação fraca, ++ imunomarcação intermediária e +++ imunomarcação forte.

1 6 CONCLUSÕES FINAIS

- 2 ● A amostra foi composta principalmente por homens e por indivíduos não
3 fumantes, com média de idade de $69,43 \pm 10,99$ anos.
- 4 ● Nas células tumorais, os perfis de imunomarcção de BCL-2 e γ -H2AX
5 foram citoplasmático e nuclear, respectivamente.
- 6 ● As amostras não tumorais adjacentes apresentaram imunomarcção
7 fraca ou ausente para ambas as proteínas.
- 8 ● O infiltrado linfocitário foi utilizado como controle interno para a
9 imunomarcção de BCL-2, pois encontrava-se sempre marcado e com
10 forte expressão da proteína.
- 11 ● Na amostra total observou-se ausência de marcação para a proteína
12 antiapoptótica BCL-2 em metade das amostras analisadas;
- 13 ● O perfil de imunomarcção de γ -H2AX na amostra total foi tanto na
14 amostra total, como no grupo “invasivo”.
- 15 ● Não houve associação significativa entre os subgrupos amostrais,
16 considerando-se presença ou não de invasão muscular ou recidivas
17 tumorais, em relação aos perfis de imunomarcção de BCL-2 ou γ -H2AX.
- 18 ● Observou-se ausência de associações ou correlações significativas entre
19 os perfis de imunomarcção de ambas as proteínas e os parâmetros
20 prognósticos ou os fatores avaliados.
- 21 ● As proteínas avaliadas não se mostraram bons marcadores para o
22 prognóstico do CUB em relação às amostras malignas de bexiga do
23 presente estudo, principalmente em relação à invasão da camada
24 muscular e recidiva tumoral.

26 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

27 Pretende-se, em estudos futuros, caracterizar o infiltrado linfocitário nas
28 amostras estudadas, uma vez que este se mostrou presente na maioria dos
29 pacientes e pode ter implicações prognósticas importantes com potencial de
30 aplicação clínica.

31
32
33

1 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

3 PINHEIRO, L. C. L; PEREIRA, E; FRANCELINO, A. L; GUEMBAROVSKI, A. F.
4 M. L; FUGANTI, P. E; OLIVEIRA, K. B; MIQUELOTO, C. A; SERPELONI, J. M;
5 GUEMBAROVSKI, R. L; Metalloproteinase 9 immunostaining prolife is positively
6 correlated with tumor grade, extraprostatic extension and biochemical recurrence
7 in prostate cancer, **Pathology - Research and Practice**, Brasil, vol. 235, p.
8 155024, dez. 2023/ jan. 2024, DOI 10.1016/j.prp.2023.155024.

9 FRANCELINO, A. L; PEREIRA, E. R; PINHEIRO, L. C. L; SOARES, A. C;
10 MENDONÇA, A. C; FUGANTI, P. E; SILVA-FRANTINE, W; OLIVEIRA, K. B;
11 SERPELONI, J. M; GUEMBAROVSKI, R. L; Allelic variants and immunostaining
12 prolife in CXCL12/CXCR4 axis: an investigation of association with prognosis in
13 prostate cancer, **Pathology - Research and Practice**, Brasil, vol. 250, p.
14 154806, set./out. 2023, DOI 10.1016/j.prp.2023.154806.

15

16 ABUFARAJ, M; SHARIAT, S; MOSCHINI, M; ROHRER, F; PAPANTONIOU, K;
17 DEVORE E; MCGRAFTH, M; ZHANG, X; MARKT, S; SCHERNHAMMER, E; The
18 impact of hormones and reproductive factors on the risk of bladder cancer in
19 women: Results from the Nurses' Health Study and Nurses' Health Study II,
20 **International Journal of Epidemiology**, Estados Unidos, vol. 49, n. 2, p. 599-
21 607, dez. 2019/jan 2020, DOI 10.1093/IJE/DYZ264.

22 ALBERTS, B; JOHNSON, X; LEWIS, J; MORGAN, D; RAFF, M; ROBERTS, K;
23 WALTER, P; WILSON, J; HUNT, T; **Biologia molecular da célula**, 6° ed. Porto
24 Alegre. Artmed Editora LTDA, 2017, p. 1-1464.

25 ALSHEIKH, A; MOHAMEDALI, Z; JONES, E; MASTERSON, J; GILKS, C. B;
26 Comparison of the WHO/ISU classification and cytokeratin 20 expression in
27 predicting the behavior of low-grade papillary urothelial tumors, **Modern**
28 **Pathology**, vol. 14, n. 4, p. 267-272, 2001, DOI 10.1038/modpathol.3880300.

29 AMERICAN CANCER SOCIETY, What is bladder cancer?, Estados Unidos,
30 American Cancer Society, disponível em:
31 [https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-](https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-cancer.html#written_by)
32 [cancer.html#written by](https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-cancer.html#written_by), acesso em 02 ago. 2022.

33 BABJUK, M; BURGER, M; CAPOUN, O; COHEN, D; COMPE, E. M; ESCRIG, J.
34 L. D; GONTERO, LIEBERG, F; MASSON-LECOMTE, A; MOSTAFID, A. H;

- 1 PALOU, J; VANTHIJN, B. G; ROUPRE, M; SHARIAT, S. F; SEISEN, T;
2 SOUKUP, V; SYLVESTER, R; European Association of urology guidelines on
3 non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1, and carcinoma in situ), **European**
4 **Urology**, Europa, vol. 81, n. 1, p. 75-94, ago. 2021/jan. 2022, DOI
5 10.1016/j.eururo.2021.08.010.
- 6 BARBOSA, A. L; VERMEULEN, S. H. H. M; ABEN, K. K; GROTENHUIS, A. J;
7 VRIELING, A; KIEMENEY, L. A; Smoking intensity and bladder cancer
8 aggressiveness at diagnosis, **PLoS One**, Países Baixos, vol. 13, n. 3, p. 1-15,
9 fev./mar. 2018, DOI 10.1371/journal.pone.0194039.
- 10 BLACKBURN, E. H. Telomerase RNA structure and function. **Cold Spring**
11 **Harbor Monograph Series**, v. 35, p. 669-694, 1998.
- 12 BOUWMAN, P; JONKERS, J; The effects of deregulated DNA damage signalling
13 on cancer chemotherapy response and resistance, **Nature Reviews Cancer**,
14 Países Baixos, vol. 12, n. 9, p. 587-598, set. 2012, DOI 10.1038/nrc3342.
- 15 BRAUSI, M; COLLETTE, L; KURTH, K; VAN DER MEIJDEN, A. P;
16 OOSTERLINCK, W; WITJES, J. A; NEWLING, D; BOUFFIOUX, C;
17 SYLVESTER, R. J; Variability in the recurrence rate at first follow-up cystoscopy
18 after TUR in Stage Ta T1 transitional cell carcinoma of the bladder: a combined
19 analysis of seven EORTC studies, **European Urology**, Itália, vol. 41, p. 523-531,
20 2002, DOI 10.1016/s0302-2838(02)00068-4.
- 21 CHAUDHARY, K. S; ABEL, P. D; LALANI, E; Role of the bcl-2 gene family in
22 prostate cancer progression and its implications for therapeutic intervention,
23 **Environmental Health Perspectives**, vol 107, p. 49-57, fev. 1999, DOI
24 10.1289/ehp.99107s149.
- 25 CHEUNG, W. L; ALBADINE, R; CHAN, T; SHARMA, R; NETTO, G. J;
26 Phosphorylated H2AX in noninvasive low grade urothelial carcinoma of the
27 bladder: correlation with tumor recurrence, **The Journal of Urology**, Estados
28 Unidos, vol. 181, p. 1387-1392, mar. 2009, DOI 10.1016/j.juro.2008.10.146.
- 29 DAE, S; ZIAMAJIDI, N; ABBASALIPOURKABIR, R; AMINZADEH, Z;
30 VAHABIRAD, M; Silver nanoparticles exert apoptotic activity in bladder cancer
31 5637 cells through alteration of Bax/Bcl-2 genes expression, **Chonnam Medical**
32 **Journal**, Irã, vol. 58, n. 3, p. 102-109, 2022, DOI 10.4068/cmj.2022.58.3.102.
- 33 DANGELO, J. G; FATTINI, C. A; **Anatomia humana sistêmica e segmentar**, 3
34 ed. São Paulo, Atheneu, 2011, p. 1-757.

- 1 FAJKOVIC, H; HALPERN, J. A; CHA, E. K; BAHADORI, T. F. G; KARAKIEWICZ,
2 P. I; BREINL, E; MERSEBURGER, A. S; SHARIAT, S. F; Impact of gender on
3 bladder cancer incidence, staging, and prognosis, **World Journal of Urology**,
4 vol. 29, n. 4, p. 457-463, mai./jun. 2011, DOI 10.1007/s00345-011-0709-9.
- 5 FLAIG, T. W; SPIESS, P. E; AGARWAL, N; BANGS, R; BOORJIAN, S. A;
6 BUYYOUNOUSKI, M. K; CHANG, S; DOWNS, T. M; EFSTATHIOU, J. A;
7 FRIEDLANDER, T; GREENBERG, R. E; GURU, K. A; GUZZO, T; HERR, H. W;
8 HOFFMAN-CENSITS, J; HOIMES, C; INMAN, B. A; JIMBO, M; KADER, A. K;
9 LELE, S. M; MICHALSKI, J; MONTGOMERY, J. S; NANDAGOPAL, L;
10 PAGLIARO, L. C; PAL, S. K; PETTERSON, A; PLIMACK, E. R; POHAR, K. S;
11 PRESTON, M. A; SEXTON, W. J; SIEFKER-RADTKE, A. O; TWARD, J;
12 WRIGHT, J. L; GURSKI, L. A; JOHNSON-CHILA, A; Bladder cancer, version
13 3.2020, **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology**, Estados Unidos, vol.
14 18, n. 3, p. 329-354, mar. 2020, DOI 10.6004/jnccn.2020.0011.
- 15 FREEDMAN, N. D; SILVERMAN, D. T; HOLLENBECK, A. R; SCHATZKIN, A;
16 ABNET, C. C; Association between smoking and risk of bladder cancer among
17 men and women, **American Medical Association**, Estados Unidos, vol 306, n.
18 7, 2011, DOI 10.1001/jama.2011.1142.
- 19 GLAB, J. A; CAO, Z; PUTHALAKATH, H; BCL-2 family proteins, beyond the veil,
20 **International Review of Cell and Molecular Biology**, vol. 351, p. 1-22, 2020,
21 DOI 10.1016/bs.ircmb.2019.12.001.
- 22 GLOBOCANa – The Global Cancer Observatory, **World Health Organization**,
23 Estimated number of new cases from 2020 to 2025, incidence, both sex, age, [0-
24 +85], Bladder, França, disponível em: [Cancer Tomorrow \(iarc.fr\)](https://gco.iarc.fr/), acesso em 28
25 jan. 2023.
- 26 GLOBOCANb – The Global Cancer Observatory, **World Health Organization**,
27 Bladder, França, disponível em: [30-bladder-fact-sheet.pdf \(who.int\)](https://www.who.int/publications/m/item/30-bladder-fact-sheet), acesso em
28 05 mar. 2024.
- 29 GRIFFITHS, A. J. F; DOEBLEY, J; PEICHEL, C; WASSARMAN, D. A;
30 **Introdução à Genética**, 12ªed, São Paulo, Guanabara Koogan, 2022, p. 1-768.
- 31 HANAHAN, D; Hallmarks of cancer: new dimensions, **Cancer Discovery**, Suíça,
32 vol. 12, n. 1, p. 31-46, jan. 2022, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

- 1 HOFFMANN, M; SCHULZ, W; Alterations of chromatin regulators in the
2 pathogenesis of urinary bladder urothelial carcinoma, **Cancers**, Alemanha, vol.
3 13, n. 33, p. 1-28, nov. 2021, DOI 10.3390/cancers13236040.
- 4 HUANG, X; PAN, T; YAN, L; JIN, T; ZHANG, R; CHEN, B; FENG, J; DUAN, T;
5 XIANG, Y; ZHANG, M; CHEN, X; YANG, Z; ZHANG, W; DING, X; XIE, T; SUI, X;
6 The inflammatory microenvironment and the urinary microbiome in the initiation
7 and progression of bladder cancer, **Genes & Diseases**, China, vol. 8, n. 6, p.
8 781-797, oct. 2020, DOI 10.1016/j.gendis.2020.10.002.
- 9 INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER- INCA, Ministério da Saúde, Brasil -
10 Estimativa de novos casos 2023, disponível em:
11 [https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf)
12 [2023.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf), acesso em 24 abr. 2023.
- 13 INSTITUTO ONCOGUIA, Organização Não Governamental Oncoguia, Brasil -
14 Sobre o câncer de bexiga, disponível em:
15 <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sobre-o-cancer/656/120/>, acesso em 03
16 nov. 2022.
- 17 JAHRREIS, V, PRADERE, B; LAUKHTINA, E; MORI, K; SHARIAT, S. F; Catalog
18 of exogenous risk factors for bladder carcinogenesis, **Current Opinion in**
19 **Urology**, Áustria, vol. 30, n. 3; 449-456, mai. 2020, DOI
20 10.1097/MOU.0000000000000753.
- 21 JANISCH, F; SHARIAT, S. F; SCHERNHAMMER, E; RINK, M; FAJKOVIC, H;
22 The interaction of gender and smoking on bladder cancer risks, **Current Opinion**
23 **in Urology**, Austria, vol. 29, n. 3, p. 249-255, 2019, DOI
24 10.1097/MOU.0000000000000602.
- 25 JUE, J. S; KORU-SENGUL, T; MIAO, F; VELÁSQUEZ, M. C; SÁVIO, L. F;
26 ALAMEDDINE, M; KROEGER, Z. A; PUNNEN, S; PAREKH, D. J; RITCH, C. R;
27 GONZALGO, M. L; Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy for muscle-
28 invasive bladder cancer: A propensity matched analysis, **Minerva Urology and**
29 **Nephrology**, Estados Unidos, vol. 73, n. 5, p. 572-580, oct. 2021, DOI
30 10.23736/S2724-6051.19.03657-9.
- 31 JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J; **Histologia básica: texto e atlas**, 13 ed. Rio
32 de Janeiro, Guanabara Koogan, 2017, p. 1-554.
- 33 KARAGAS, M. R; PARK, S; WARREN, A; HAMILTON, J; NELSON, H. H; MOTT,
34 L. A; KELSEY, K. T; Gender, smoking, glutathione-S-transferase variants and

- 1 bladder cancer incidence: a population-based study, **Cancer Letters**, Estados
2 Unidos, vol. 2019, n. 1, p. 63-69, 2005, DOI 10.1016/j.canlet.2004.10.006.
- 3 KERR, J. F. R; WYLLIE, A. H; CURRIE, A. R; Apoptosis: a basic biological
4 phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics, **British Journal of**
5 **Cancer**, Escócia, vol. 26, p. 239-257, 1972.
- 6 KIM, L. H. C; PATEL, M. I; Transurethral resection of bladder tumour (TURBT),
7 **Translational Andrology and Urology**, Austrália, vol. 9, n. 6, p. 3056-3072,
8 2020, DOI 10.21037/tau.2019.09.38.
- 9 KHADRA, M. H; PICKARD, R. S; CHARLTON, M; POWELL, P. H; NEAL, D. E;
10 A prospective analysis of 1930 patients with hematuria to evaluate current
11 diagnostic practice, **The Journal of Urology**, Reino Unido, vol. 163, p. 524-527,
12 fev. 2000, DOI 10.1016/S0022-5347(05)67916-5.
- 13 KLUCK, R. M; BOSSY-WETZEL, E; GREEN D. R; NEWMeyer, D. D; the
14 release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of
15 apoptosis, **Science**, Estados Unidos, vol. 275, n. 5303, p. 1132-1136, jan./fev.
16 1997, DOI 10.1126/science.275.5303.1132.
- 17 KØNIG, S. M; RISSLER, V; TERKELSEN, T; LAMBRUGHU, M; PAPALEO, E;
18 Alterations of the interactome of BCL-2 proteins in breast cancer at the
19 transcriptional, mutational, and structural level, **PLoS Computational Biology**,
20 Dinamarca, vol. 15, n. 12, p. 1-28, oct./dez. 2019, DOI
21 10.1371/journal.pcbi.1007485.
- 22 KOGEVINAS, M; MANNETJE, A; CORDIER, S; RANFT, U; GONZALEZ, C. A;
23 VINCIS, P; CHANG-CLAUDE, J; LYNGE, E; WAHRENDORF, J; TZONOU, A;
24 JOCKEL, K; SERRA, C; PORRU, S; HOURS, M; GREISER, E; BOFFETA, P;
25 Occupation and bladder cancer among men in Western Europe, **Cancer Causes**
26 **and Control**, Espanha, vol. 14, p. 907-914, 2003, DOI
27 10.1023/b:caco.0000007962.19066.9c.
- 28 KORNBERG, R. D; Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA,
29 **Science**, vol. 184, n. 4139, p. 868-871, mai. 1974, DOI
30 10.1126/science.184.4139.868.
- 31 KORSMEYER, S. J; SHUTTER, J. R; VEIS, D. J; MERRY, D. E; OLTVAI, Z. N;
32 Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death,
33 **Seminars in cancer biology**, vol. 4 n. 6, p. 327-332, dez. 1993.

- 1 KROEMER, G; GALLUZZI, VANDENABEELE, P; ABRAMS, J; ALNEMRI, E. S;
2 BAEHRECKE, E. H; BLAGOSKLONNY, M. V; EL-DEIRY, W. S; GOLSTEIN, P;
3 GREEN, D. R; HENGARTNER, M; KNIGHT, R. A; KUMAR, S; LIPTON, S. A;
4 MALORNI, W; NUÑEZ, G; PETER, M. E; TSCHOPP, J; YUAN, J; PIACENTINI,
5 M; ZHIVOTOVSKY, B; MELINO, G; Classification of cell death:
6 recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009, **Cell death**
7 **and differentiation**, vol. 16, n. 1, p. 3-11, 2009, DOI 10.1038/cdd.2008.150.
- 8 LENIS, A. T; LEC, P. M; CHAMIE, K; Bladder cancer a review, **Journal of the**
9 **American Medical Association**, Estados Unidos, vol. 324, n. 19, p. 1980-1991,
10 ago. 2020, DOI 10.1001/jama.2020.17598.
- 11 LINDAHL, T; KARRAN, P; WOOD, D. R; DNA excision repair pathways,
12 **Chromosomes and expression mechanisms**, Reino Unido, vol. 7, p. 158-169.
- 13 LONG, X; XIONG, W; ZENG, X; QI, L; CAI, Y; MO, M; JIANG, H; ZHU, B; CHEN,
14 Z; LI, Y; Cancer-associated fibroblasts promote cisplatin resistance in bladder
15 cancer cells by increasing IGF-1/ER β /BCL-2 signalling, **Cell Death & Disease**,
16 China, vol. 10, n. 5, p. 1-16, abr./mai. 2019, DOI 10.1038/s41419-019-1581-6.
- 17 MATSUDA, Y, WAKAI, T; KUBOTA, M; OSAWA, M; TAKAMURA, M;
18 YAMAGIWA, S; AOYAGI, Y; SANPEI, A; FUJIMAKI, S; DNA damage sensor γ -
19 H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma, **The**
20 **Scientific World Journal**, Japão, vol. 2013, n. 597095, p.1-7, fev. 2013, DOI
21 10.1155/2013/597095.
- 22 MODRICH, P; Mechanisms in *E. coli* and human mismatch repair (Nobel
23 Lecture), **Angewandte chemie - International Edition**, vol. 55, n. 30, p. 8492-
24 8501, DOI 10.1002/anie.201601412.
- 25 MOORE, K. L; DALLEY, A. F; AGUR, A. M. R; **Anatomia orientada para a**
26 **clínica**, 8 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2017, p. 1-1096.
- 27 NAGELKERKE, A; VAN KUJIK, S; MARTENS, J; SWEEP, C. G. F;
28 HOOGERBRUGGE, N; BUSSINK, J. SPAN, P. N; Poor prognosis of constitutive
29 γ -H2AX expressing triple-negative breast cancers is associated with telomere
30 length. **Biomarkers in medicine**, Países Baixos, v. 9, n. 4, p. 383-390, mar. 2015
31 DOI 10.2217/bmm.15.2.
- 32 National Comprehensive Cancer Network, Guidelines for patients bladder
33 cancer, **Nacional Comprehensive Cancer Network**, p. 1-80, 2021.

- 1 NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CANCER, **Bladder cancer:**
2 **diagnosis and management**, p. 1-500, 2015.
- 3 NAKOPOULOU, L; VOURLAKOU, C; ZERVAS, A; TZONOU, A; GAKIOPOLOU,
4 H; DIMOPOULOS, M; The prevalence of bcl-2, p53 and Ki-67 immunoreactivity
5 in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates,
6 **Human Pathology**, vol. 29, n. 2, p. 148-154, fev. 1998.
- 7 NICE GUIDANCE, Bladder cancer: diagnosis and management of bladder
8 cancer, **The British Journal of Urology International**, Inglaterra, vol. 120, n. 6,
9 p. 755-765, 2017, DOI 10.1111/bju.14045.
- 10 OBERDOERDFFER, P; MILLER, K. M; Histone H2A variants: Diversifying
11 chromatin to ensure genome integrity, **Seminars in Cell and Developmental**
12 **Biology**, Estados Unidos, mar. 2022, DOI 10.1016/j.semcdb.2022.03.011.
- 13 ONTARIO HEALTH, Enhanced visualization methods for first transurethral
14 resection of bladder tumour in suspected non-muscle-invasive bladder cancer: A
15 Health Technology Assessment, **Ontario Health Technol Assess Ser**, Canadá,
16 vol. 21, n. 12, p. 1-123, ago 2021.
- 17 OTAKE, H; MIWA, M; FUJIMURA, S; SUGIMURA, T; Binding of ADP-ribose
18 polymer with histone, **The Journal of Biochemistry**, Japão, vol. 65, b. 1, 1969.
- 19 PALLA, V; KARAOLANIS, G; KATAFIGIOTIS, I; ANASTASIOU, I; PATAPIS, P;
20 DIMITROULIS, D; PERREA, D; Gamma-H2AX: Can it be established as a
21 classical cancer prognostic factor? **Tumor Biology**, Alemanha, vol.39, n. 3, p, 1-
22 11, dez. 2016/mar. 2017, DOI 10.1177/1010428317695931.
- 23 PAULL, T. T; ROGAKOU, E. P; YAMAZAKI, V; KIRCHGESSNER, C. U;
24 GELLERT, M; BONNER, W. M; A critical role for histone H2AX in recruitment of
25 repair factors nuclear foci after DNA damage, **Research Paper**, Estados Unidos,
26 vol. 10, n. 15, p. 886-895, jun./jul. 2000, DOI 0.1016/S0960-9822(00)00610-2.
- 27 PEREIRA, E. R; PINHEIRO, L. C. L; FRANCELINO, A. L; MIQUELOTO, C. A;
28 GUEMBAROVSKI, A. F. M. L; DE OLIVEIRA, K. B; FUGANTI, P. E; CÓLUS, I.
29 M. S; GUEMBAROVSKI, R. L; Tissue immunostaining of candidate prognostic
30 proteins in metastatic and non-metastatic prostate cancer, **Journal of Cancer**
31 **Research and Clinical Oncology**, Brasil, p. 1-11, ago 2022, DOI
32 10.1007/s00432-022-04274-w.
- 33 POWLES, T; BELLMUNT, J; COMPERAT, E; HUDDART, R; LORIOT, Y;
34 NECCHI, A; VALDERRAMA, B. P; RAVAUD, A; SHARIAT, S. F; SAZABADOS,

- 1 B; VAN DER HEIJEN, M. S; GILLESSEN S; Bladder cancer: ESMO clinical
2 practice guideline for diagnosis treatment and follow-up, **Annals of Oncology**,
3 vol. 33, n. 3, p. 244-258, 2022, DOI 10.1016/j.annonc.2021.11.012.
- 4 QI, Y; TOYOOKA, T; NIE, J; OHTA, H; KODA, S; WANG, R; Comparative γ -
5 H2AX analysis for assessment of the genotoxicity of six aromatic amines
6 implicated in bladder cancer in human urothelial cell line, **Toxicology in Vitro**,
7 Japão, vol. 66, n. 104880, p. 1-9, abr./mai. 2020, DOI 10.1016/j.tiv.2020.104880.
- 8 RACHAKONDA, P. S; HOSEN, I; VERDIER, P. J; FALLAH, M; HEIDENREICH,
9 B; RYK, C; WIKLUND, N. P; STEINECK, G; SCHADENDORF, D; HEMMINKI, K;
10 KUMAR, R; TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival
11 and disease recurrence through modification by common polymorphism,
12 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**
13 **America**, Alemanha, vol. 110, n. 43, p. 17426-1731, set./oct. 2013, DOI
14 10.1073/pnas.1310522110.
- 15 REED, O; JUBBER, I; GRIFFIN, J; NOON, A. P; GOODWIN, L; HUSSAIN, S;
16 CUMBERBATCH, M. G; CATTO, J. W. F; Occupational bladder cancer: A cross
17 section survey of previous employments, tasks and exposures matched to cancer
18 phenotypes, **PLOS ONE**, Inglaterra, p. 1-15, oct. 2020, DOI
19 10.1371/journal.pone.0239338.
- 20 REZAEIAN, A. H; LI, C; WU, C; ZHANG, X; DELACERDA, J; YPU, M. J; HAN, F;
21 CAI, Z; JEONG, Y. S; JIN, G; PHAN, L; CHOU, P; LEE, M; HUNG, M;
22 SARBASSOV, D; LIN, H; A hypoxia-responsive TRAF6-ATM-H2AX signalling
23 axis promotes HIF1 α activation, tumorigenesis and metastasis, **Nature Cell**
24 **Biology**, Estados Unidos, vol. 19, n. 1, p. 38-51, oct./dez. 2016, DOI
25 10.1038/ncb3445.
- 26 ROGAKOU, E. P; PILCH, D. R; ORR, A. H; IVANOVA, V. S; BONNER, W. M;
27 Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*,
28 **The Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, vol. 273, n. 10, p. 5858-
29 5868, mar. 1998, DOI 10.1074/jbc.273.10.5858.
- 30 RÜBBEN, H; LUTZEYER, W; FISCHER, N; DEUTZ, F; LAGRANGE, W; GIANI,
31 G; Natural history and treatment of low and high risk superficial bladder tumors,
32 **The journal of urology**, Alemanha, vol. 139, n. 2, p. 283-285, 1988, DOI
33 10.1016/S0022-5347(17)42387-1.

- 1 SAGINALA, K; BARSOUK, A; ALURU, J. S; RAWLA, P; PADALA, S. A;
2 BARSOUK, A; Epidemiology of bladder cancer, **Medical Science**, Estados
3 Unidos, vol. 8, n. 15. p. 11-25, mar. 2020, DOI 10.3390/medsci8010015.
- 4 SANCAR, A; RUPP, W. D; A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease
5 of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region, **Cell**,
6 Estados Unidos, vol. 33, p. 249-260, mai 1983, DOI
- 7 SANGUEDOLCE, F; CALÒ, B; MANCINI, V; ZANELLI, M; PALICELLI, A; ZIZZO,
8 M; ASCANI, S; CARRIERI, G; CORMIO, L; Non-muscle invasive bladder cancer
9 with variant histology: biological features and clinical implications, **Oncology**,
10 Itália, vol. 99, n. 6, p. 345-358, dez. 2020/ mar. 2021, DOI 10.1159/000514759.
- 11 SCHULZ A; LOLOI, J; MARINA, P. L; SANKIN, A; The development of non-
12 invasive diagnostic tools in bladder cancer, **OncoTargets and Therapy**, Estados
13 Unidos, vol. 15, p. 497-507, maio/abr. 2022, DOI 10.2147/OTT.S283891.
- 14 SHORE, N. D; REDORTA, J. P; ROBERT, G; HUTSON, T. E; CESARI, R;
15 HARIHARAN, S; FABBA, O. R; BRIGANTI, A; STEINBERG, G. D; Non-muscle-
16 invasive bladder cancer: an overview of potential new treatment options,
17 **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, Estados Unidos,
18 vol. 39. n. 10, p. 642-663, 2021, DOI 10.1016/j.urolonc.2021.05.015.
- 19 SINGH, R; LETAI, A; SAROSIEK, K; Regulation of apoptosis in health and
20 disease: the balancing act of BCL-2 family proteins, **Nature Reviews Molecular**
21 **Cell Biology**, Estados Unidos, vol. 20, n. 3, p. 175-193, mar. 2019, DOI
22 10.1038/s41580-018-0089-8.
- 23 STUCKI, M CLAPPERTON, J. A; MOHAMMAD, D; YAFFE, M. B; SMERDON, S.
24 J; JACKSON, S. P; **Cell**, Reino Unido, vol. 123, n. 7, p. 1213-1226, set./dez.
25 2005, DOI 10.1016/j.cell.2005.09.038.
- 26 SUZUKI, S; GI, M; TOYODA, T; KATO, H; NAIKI-ITO, A; KAKEHASHI, A;
27 OGAWA, K; TAKAHASHI, S; WANIBUCHI, H; Role of γ -H2AX as a biomarker for
28 detection of bladder carcinogens in F344 rats, **Journal of toxicologic**
29 **Pathology**, Japão, vol. 33, n. 4, p. 279-285, jul. / ago. 2020, DOI
30 10.1293/tox.2020-0038.
- 31 TASKOVSKA, M; KREFT, M. E; SMRKOLJ, T; Current and innovative
32 approaches in the treatment of non-muscle invasive bladder cancer: the role of
33 transurethral resection of bladder tumor and organoids, **Radiology and**

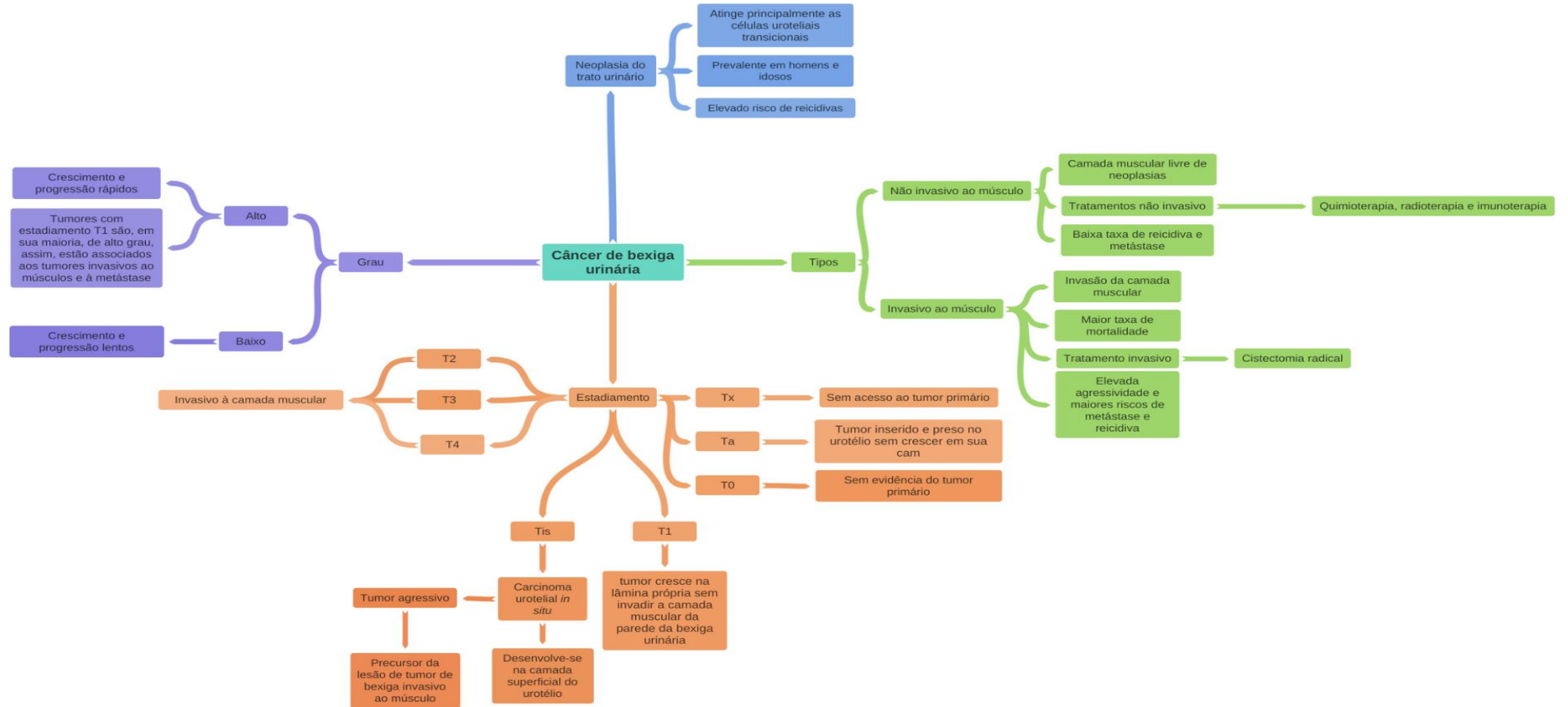
- 1 **Oncology**, Eslovênia, vol. 54, n. 2, p. 135-143, 2020, DOI 10.2478/raon-2020-
2 0025.
- 3 THUN, M. J; CARTER, B. D; FESKANICH, D; FREEDMAN, N. D; PRENTICE, R;
4 LOPEZ, A. D; HARTGE, P; GAPSTUR, S. M; 50-year trends in smoking-related
5 mortality in the United States, **New England Journal of medicine**, Estados
6 Unidos, vol. 368, n. 4, jan. 2013, DOI 10.1056/nejmsa1211127.
- 7 TURKEY, P; SEGERSTEN, U; MALMSTRÖM, P; HEMDAN, T; Is Bcl-2 a
8 predictive marker of neoadjuvant chemotherapy response in patients with
9 urothelial bladder cancer undergoing radical cystectomy?, **Scandinavian**
10 **Journal of Urology**, Suécia, vol. 53, n. 1, p. 45-50, fev. 2019, DOI
11 10.1080/21681805.2019.1575467.
- 12 ULBRIGHT, T. M; AMIN, M. B; BALZER, B; BERNEY, D. M; EPSTEIN, J. I; GUO,
13 C; IDREES, M. T; LOOIJENGA, L. H. J; PANER, G; RAJPERT-DE MEYTS, E;
14 SKAKKEBAEK, N. E; TIKOO, S. K; YILMAS, A; OOSTERHUIS, J. W; **WHO**
15 **classification of tumours the urinary system and male genital organs**, 4° ed,
16 Ubright & V. E. Reuter, 2016, p. 1-226.
- 17 UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL (UICC), **TNM**
18 **classification of malignant tumours**, 8° ed, Reino Unido, Oxford, p. 198-199,
19 2017.
- 20 WANG, C; TSAI, Y; JENG, Y; Biological significance of GATA3, cytokeratin 20,
21 cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer, **Plos One**,
22 Taiwan, vol. 14, n. 8, p.1-14, ago. 2019 DOI 10.1371/journal.pone.0221785.
- 23 WATSON, J. D; BAKER, T. A; BELL, S. P; GANN, A; LEVINE, M; LOSICK, R;
24 **Biologia molecular do gene**, 7° ed. Porto Alegre. Artmed Editora LTDA, 2015,
25 p. 1-878.
- 26 WEI, M. C; ZONG W; CHENG, H. E; LINDSTEN, T; PANOUTSAKOPOULOU, V;
27 ROSS, J. A; ROTH, K. A; MACGREGOR, G. R; THOMPSON, C. B;
28 KORSMEYER, S. J; Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to
29 mitochondrial dysfunction and death, **Science**, Estados Unidos, vol. 292, n.
30 5517, p. 727-730, 2001, DOI 10.1126/science.1059108.
- 31 WOJTCZYK-MIASKOWSKA, A; SCHLICHTHOLZ, B; Tobacco carcinogens and
32 the methionine metabolism in human bladder cancer, **Mutation Research -**
33 **Reviews in Mutation Research**, Polônia, vol. 178, n. 108281, jun./jul. 2019, DOI
34 10.1016/j.mrrev.2019.06.001.

- 1 YAMADA, T; TOYODA, T; MATSUSHITA, K; CHO, Y; AKAGI, J; MORIKAWA, T;
2 MIZUTA, Y; OGAWA, K; Expression of stem cell markers as useful
3 complementary factors in the early detection of urinary bladder carcinogens by
4 immunohistochemistry for γ -H2AX, **Archives of toxicology**, Japão, vol. 95, n. 2,
5 p. 715-726, nov. 2020, DOI 10.1007/s00204-020-02950-9.
- 6 ZENG M; SU, Y; LI, K; JIN, D; LI, Q; LI, Y; ZHOU, B; Gallic acid inhibits bladder
7 cancer T24 cell progression through mitochondrial dysfunction and PI3K/Akt/NF-
8 κ B signaling suppression, **Frontiers in Pharmacology**, China, vol. 11, n. 1222,
9 p. 1-17, ago. 2020, DOI 10.3389/fphar.2020.01222.
- 10 ZHAN, X; CHEON, T, Jiang, M; DENG, W; LIU, X; CHEN, L; FU, B; A novel
11 nomogram and risk classification system predicting the cancer-specific survival
12 of muscle-invasive bladder cancer patients after partial cystectomy, **Journal of**
13 **Oncology**, China, vol. 2022, p. 1-10, dez./mar. 2022, DOI
14 10.1155/2022/2665711.

9. ANEXOS

ANEXO I

Figura 6. Resumo dos principais conceitos sobre o CUB urinária.



FONTE: elaborado pelo próprio autor.

ANEXO II**Chamada:****Projeto de Pesquisa**

TÍTULO DO PROJETO: “Biomarcadores de instabilidade genômica e epigenética na suscetibilidade, prognóstico e *follow up* de pacientes com câncer de bexiga”

tendo como Instituição-sede:

- Universidade Estadual de Londrina

e como Instituições participantes:

- Hospital do Câncer de Londrina
- UNIFESP – Campus Baixada Santista

COORDENADORA DO PROJETO: Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni

COLABORADORES: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski

Resumo

De acordo com a *Global Cancer Statistics*, o CaB é o décimo mais diagnosticado no mundo, representando 3% dos casos (573,278) e 2,1% das mortes (212,536). É mais comum em homens do que em mulheres, com respectivas taxas de incidência e mortalidade de 9,5 e 3,3 por 100.000 homens, aproximadamente 4 vezes aquelas entre as mulheres em todo o mundo. Do ponto de vista do tratamento, o CaB representa um espectro de doenças, desde tumores não invasivos recorrentes tratados cronicamente, até doenças agressivas ou em estágio avançado que requerem tratamento multimodal e invasivo. Nos últimos anos, inibidores de checkpoints do sistema imunológico (ICIs) utilizando como alvo as proteínas PD-1 e CTLA4 têm se tornado uma estratégia no tratamento do CaB, junto com tratamentos clássicos como cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou terapia direcionada. No entanto, o cenário continua desafiador, uma vez que a taxa de recorrência desses tumores continua alta apesar dos novos tratamentos propostos e a manifestação clínica tardia dificulta seu estudo e compreensão. Dessa forma, pesquisas envolvendo alterações moleculares (polimorfismos genéticos, marcadores de instabilidade genômica e epigenética) voltadas para a descoberta e validação de biomarcadores de

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Juliana Mara Serpeloni, Ilce Mara de Syllos Cólus e Roberta Losi-Guembarovski, da Universidade Estadual de Londrina o(a) convidamos para nossa pesquisa e solicitamos sua colaboração e o seu consentimento para incluí-lo(a) em nosso projeto de pesquisa “Biomarcadores biológicos na suscetibilidade, prognóstico e *follow up* de pacientes com câncer de bexiga”. O objetivo deste estudo é avaliar biomarcadores que possam aumentar ou diminuir a suscetibilidade ao câncer de bexiga e que possam auxiliar na sua prevenção e tratamento.

Assim, solicitamos a sua autorização para que uma pequena quantidade de seu sangue (20 mL) seja coletado via punção venosa (picada na veia) com seringa e agulha descartáveis. Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional para a sua pessoa, além da picada da agulha. Para evitar desconforto e situações que possam causar algum risco para os pacientes, o sangue será coletado por profissionais da saúde que desenvolvem normalmente esse procedimento. Solicitamos também a coleta de uma pequena amostra de urina (50mL). Pedimos sua autorização para que moléculas obtidas a partir deste material (DNA, RNA ou proteínas) possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) da UEL. O material obtido ficará armazenado no Laboratório sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Solicitamos também sua autorização para que possamos consultar seu prontuário médico e obter alguns dados clínicos do seu tratamento para o câncer de bexiga e a sua evolução clínica, bem como os blocos de parafina com amostras do tecido da bexiga retiradas durante a cirurgia no hospital. Solicitamos-lhe o preenchimento de um questionário sobre seu estilo de vida e histórico de exposição, onde o (a) sr (a) será identificado(a) apenas por um código, preservando sua identidade. Estes questionários ficarão armazenados no LAMON/UEL e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Esclarecemos que o(a) sr(a) a qualquer momento tem a liberdade de se recusar em contribuir com o estudo, sem ser prejudicado(a) no seu tratamento e acompanhamento médico. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, preservando sua identidade. Esses resultados provavelmente não trarão benefícios para a sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para a redução do número de pacientes com tumores de bexiga, assim como para o tratamento clínico. O TCLE será em duas vias, sendo uma entregue ao participante e a outra que ficará com pesquisador

No caso de autorizado, o(a) sr(a). deverá assinar este Termo de Consentimento.

Desde já agradecemos sua colaboração.

Nome do voluntário

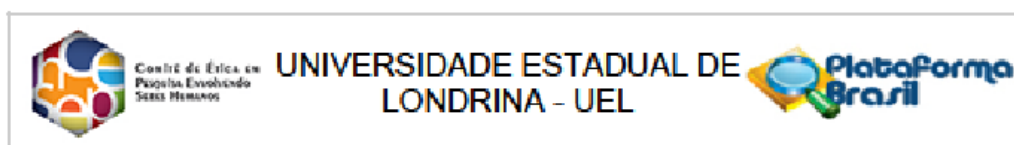
Assinatura

RG: _____

Pesquisador responsável: _____

Londrina, ____ de _____ de 2021

ANEXO IV



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores de instabilidade genômica e epigenética na suscetibilidade, prognóstico e follow up de pacientes com câncer de bexiga

Pesquisador: Juliana Mara Serpeloni

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais);

Versão: 3

CAAE: 47092521.2.1001.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Biologia Geral

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.787.842

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1747072.pdf" de 15/08/2021.

Resumo: De acordo com a Global Cancer Statistics, o CaB é o décimo mais diagnosticado no mundo, representando 3% dos casos (573,278) e 2,1% das mortes (212,538). É mais comum em homens do que em mulheres, com respectivas taxas de incidência e mortalidade de 9,5 e 3,3 por 100.000 homens, aproximadamente 4 vezes aquelas entre as mulheres em todo o mundo. Do ponto de vista do tratamento, o CaB representa um espectro de doenças, desde tumores não invasivos recorrentes tratados cronicamente, até doenças agressivas ou em estágio avançado que requerem tratamento multimodal e invasivo. Nos últimos anos, inibidores de checkpoints do sistema imunológico (ICIs) utilizando como alvo as proteínas PD-1 e CTLA4 têm se tornado uma estratégia no tratamento do CaB, junto com tratamentos clássicos como cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou terapia direcionada. No entanto, o cenário continua desafiador, uma vez que a taxa de recorrência desses tumores continua alta apesar dos novos tratamentos propostos e a manifestação clínica tardia dificulta seu estudo e compreensão. Dessa forma, pesquisas envolvendo alterações moleculares

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO V**Laboratório de Mutagênese e Oncogenética (LAMON) - UEL**

Código

n° _____

HISTÓRICO PESSOAL:

1- Registro Institucional: Hospital do Câncer de Londrina

2- Sexo: Masculino () Feminino ()

3- Idade: _____

4- Data de nascimento: ____ / ____ / ____

5- Local de nascimento:
_____ UF: _____6- Local de residência: Cidade:
_____ UF: _____

Rua: _____ n° _____

Telefone: _____ e-mail: _____

7- Sua moradia é na zona rural ou urbana?

() RURAL () URBANA

8- Há quanto tempo reside neste local?
_____ anos _____ meses.

9- Profissão: _____

10- Grau de instrução:

() Ensino Fundamental (antigo 1º grau) incompleto () completo

() Ensino Médio (antigo 2º grau) incompleto () completo

() Ensino Superior/Graduação incompleto () completo

() Pós Graduação incompleto () completo

Curso Técnico incompleto completo
)

11- A qual grupo étnico você pertence ?

Negro Caucasiano Asiático Indígena
 Outros

12- Ancestralidade (assinalar e descrever)

Europeia (qual
 ?) _____
 Africana (qual ?)

Indígena (qual
 ?) _____

Oriental (qual
 ?) _____

Mestiça (qual
 ?) _____

13- Informações dos familiares do indivíduo:

Nome completo do
 pai: _____

Nome da
 mãe: _____

Tamanho da irmandade (incluindo você):

Total: _____
 Vivos: _____

14 - Você possui algum irmão gêmeo idêntico?

SIM NÃO

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho:

15- Você já se expôs a algum destes agentes/substâncias listados abaixo em seu trabalho ou em alguma outra atividade que exerce ?

Se SIM, por quanto tempo e há quanto tempo foi
 isso: _____

Derivados de petróleo

(querosene, gasolina, solventes etc.) _____
 SIM NÃO

Tintas e/ou corantes _____
 SIM NÃO

Compostos usados em Indústrias têxteis ou de tecelagem
 SIM NÃO

Praguicidas e/ou herbicidas _____
 SIM NÃO

Radiação _____
 SIM NÃO

Metais pesados (Chumbo, Níquel, Cromo, etc...) _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas no processamento de madeira _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas na indústria de papel ou celulose _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas em Mineração _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas na indústria de calçados ou curtume _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas em Metalurgia _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas em Usina de açúcar ou álcool _____
 SIM NÃO

Substâncias usadas em processamento de Plástico ou borracha _____
 SIM NÃO

Sol _____
 SIM NÃO

Se SIM, especifique tempo e período do dia: _____

Outras substâncias químicas ou agentes físicos _____
 SIM NÃO

Se _____ SIM,
 especifique: _____

16- Você utiliza ou utilizava equipamentos de proteção individual (máscaras, luvas, óculos, chapéu, roupas apropriadas, protetor solar etc.):
 SIM NÃO

Histórico Tabagista:

17- Você fuma atualmente? () SIM () NÃO

18- Se SIM, qual a quantidade de cigarros que fuma por dia?

() menos de meio maço () de meio a um maço () mais de um maço

19- Se NÃO, já foi fumante? Há quanto tempo parou de fumar?

() nunca fumei

parei de fumar há () 0-5 anos () 5-10 anos () mais de 10 anos

20- Você convive ou conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?

() SIM () NÃO

Histórico de Etilismo:

21- Você consome bebidas alcoólicas? () SIM () NÃO

22- Se SIM, que tipo de bebida alcoólica você costuma consumir?

() Destiladas () Não-destiladas () Outras () Ambas

23- Quanto você costuma beber por semana?

() até 1 copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 copos () mais de 10 copos

24- Se já parou há quanto tempo não consome mais esta bebida?

() 0-5 anos () 6-10 anos () mais de 10 anos

25- Quanto você costumava beber por semana?

() até 1 copo () de 2 a 5 copos () de 6 a 10 copos () mais de 10 copos

26- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

() SIM () NÃO

Histórico de Saúde:

27- Nos últimos 2 anos você tomou algum medicamento diariamente?

() SIM () NÃO () NÃO SABE

Se SIM, especifique:

() Hormônio	() Anti-inflamatório	()
Analgésicos		
() Anti-hipertensivos	() Anabolizantes	()
Imunossupressores		
() Multivitamínicos	() Antibióticos	()
) Antianêmicos		
() Tranquilizantes	() Vitaminas	()
Antifúngicos		
() Antialérgicos	() Tranquilizantes	()
Antiarrítmicos		
()		

Outros: _____

28- Você tem:

A - Alguma lesão na pele?	() SIM	() NÃO	
B - Verrugas?	() SIM	() NÃO	
C - Gastrite?	() SIM	() NÃO	
D - Catarata?	() SIM	() NÃO	
E - Micose?	() SIM	() NÃO	qual?

Se sim, _____

F - Diabetes?	() SIM	() NÃO	
G - Hipertensão arterial?	() SIM	() NÃO	
H - Doença cardiovascular?	() SIM	() NÃO	
I - Osteoporose?	() SIM	() NÃO	
J - Anemia?	() SIM	() NÃO	
L - Sopro?	() SIM	() NÃO	
M - Hepatite?	() SIM	() NÃO	

Outros problemas () Qual: _____

29- Você já foi submetido a algum tipo de cirurgia?

() SIM () NÃO

Se SIM, especifique:

Tipo: _____ Ano: _____

30- Você já foi submetido a algum tipo de transplante?

() SIM () NÃO

Se SIM, especifique:

() Rim	() Fígado	() Pulmão	() Coração
() Córnea	() Medula		

() 1 vez () 2 vezes () 3 vezes
Qual a data do
transplante: _____

31- Você já recebeu transfusão sanguínea?
() SIM () NÃO Quantas?

32- Você tem antecedentes de câncer em sua família? () SIM
() NÃO

33- Em casos de câncer na família, qual era o vínculo de parentesco?
() Pai () Mãe () Filho () Tio ()
() Primo () Outro
Se OUTRO, especifique:

34- Qual foi a localização do tumor?
Especifique: _____

Dados relacionados ao câncer

35- Tipo histológico:
() carcinoma urotelial () carcinoma
de células escamosas
() carcinoma de células pequenas () adenocarcinoma
() outros

37- Você já foi tratado anteriormente devido a algum tipo de câncer?
() SIM () NÃO
Se SIM, especifique o tipo:

Histórico Alimentar: (refira-se somente aos hábitos frequentes):

39- Você se alimenta apenas de vegetais? () SIM () NÃO

40- Você come carne? () SIM () NÃO

41- Se SIM, com que frequência você come as carnes listadas abaixo:

	1-2 dias/semana	3-4 dias/semana	5-6 dias/semana	diariam ente
--	--------------------	--------------------	--------------------	-----------------

Carne bovina				
Peixe				
Frang o				
Porco				
Outros				