

**AVALIAÇÃO DA DETECÇÃO DE HIPERMETILAÇÃO DE
PROMOTORES GÊNICOS COMO MARCADOR
MOLECULAR PARA O CÂNCER DE BEXIGA**

MARIANA BRAIT RODRIGUES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora:

Dra. Otávia Luisa Silva Damas Caballero

Co-Orientador:

Dr. André Luiz Vettore De Oliveira

São Paulo

2003



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Brait, Mariana

Avaliação da detecção de hipermetilação de promotores gênicos como marcador molecular para o câncer de bexiga / Mariana Brait Rodrigues de Oliveira -- São Paulo, 2003.

94p.

Dissertação(mestrado)—Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Otávia Luisa Silva Damas Caballero.

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA BEXIGA. 2. METILAÇÃO DE DNA. 3. MARCADOR DE TUMOR. 4. REGIÕES PROMOTORAS/genética.

EXEMPLAR
ESPECIAL

*Só peço a você um favor, se puder,
Não me esqueça num canto qualquer.
("O Caderno" de Toquinho e Mutinho)*

FUNDAÇÃO ANTONIO
CARLOS
BIBLIOTECA

DEDICATÓRIA

Dedico a minha dissertação em primeiro lugar para a minha mãe Beth Brait pela ajuda incondicional na escrita deste trabalho, pela paciência durante esse período e principalmente por acreditar nos meus sonhos e financiá-los, aprendendo muito sobre a misteriosa Genética do Câncer, uma área completamente diferente da sua.

Dedico também ao meu pai Moracy Rodrigues de Oliveira e à minha madrastra Rosemary Vernice da Silva, por sempre acreditarem em mim e no meu trabalho e por bancarem e concordarem com os meus sonhos.

Dedico especialmente à minha orientadora Dra. Otávia Caballero e ao meu co-orientador Dr. André Vettore pelo enorme aprendizado em conjunto, pelo trabalho competente e convívio muito agradável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha querida orientadora Dra. Otávia Caballero pela coragem de ter me aceitado como aluna com apenas algumas conversas, pelo carinho durante esses dois anos, por tudo o que ela me ensinou com paciência e pela confiança em mim e no meu trabalho.

Agradeço ao meu querido co-orientador Dr. André Vettore por ter aparecido em uma boa hora e ter dado uma contribuição importante ao meu aprendizado, pela amizade e por todas as correções sem fim.

Agradeço à melhor companheira de laboratório que alguém poderia ter: Marcia Dellamano, por me acompanhar nas noites dentro e fora do laboratório, por tornar a ida de final de semana ao Ludwig um prazer, por sempre ter estado pronta para me ajudar no laboratório, pelas opiniões compartilhadas, pela enorme amizade e por tantas outras coisas.

Agradeço a Andréa Seixas pela ajuda neste trabalho, principalmente no começo: me ensinado as coisas mais básicas do laboratório e no final, pela grande mãozinha e pelas eternas conversas gostosas e pelo jeito T.O.C. de ser.

Agradeço a todo o pessoal do laboratório pela boa convivência: Fábio Piccoli pelas ajudas com seu jeito T.O.C. e pelas conversas secretas em francês, Danielle Renzoni pelas conversas sinceras, Adriana Bulgarelli pelo divertido convívio, Fabrício Carvalho pela ajuda principalmente nas fotos de gel, Simone Srendi pelo carinho e microdissecção de amostras congeladas, Valéria Paixão principalmente pelo o que me ensinou no começo, Luiz Fernando Lopes pelas lições sobre Pediatria.

Agradeço a Hugo Campos do Departamento de Anatomia Patológica, pela competente seleção e microdissecção das amostras e pela pessoa agradável e sempre disposta que ele foi durante esses dois anos.

Agradeço ao Dr. Fernando Soares do Departamento de Anatomia Patológica pela importante colaboração nesse trabalho, na seleção e revisão das amostras, sempre disposto a ajudar.

Agradeço ao Dr. Álvaro Sarkis pelas opiniões clínicas, pela complementação dos resultados e pelas aulas sobre Câncer de Bexiga.

Agradeço ao Dr. Marcos Leal pela rápida coleta dos dados clínicos adicionais e esclarecimento sobre os mesmos.

Agradeço ao Dr. André Carvalho pela valiosa ajuda na análise estatística e pelas explicações muito claras dadas sobre elas.

Agradeço à Dra. Maria do Rosário Latorre e à Dra. Karina Ribeiro pela supervisão na análise estatística.

Agradeço a Charles Anacleto e Rosane Sturzeneker do Laboratório GENE de Minas Gerais pela contribuição na padronização das reações.

Agradeço à Dra. Carmen Jerónimo do Departamento de genética do Portuguese Oncology Institute, pelos valiosos protocolos fornecidos.

Agradeço ao Dr. Andrew Simpson pela colaboração para este trabalho e por ter me permitido fazer parte do Laboratório de Genética do Câncer.

Agradeço ao Dr. Ricardo Brentani, diretor do Instituto Ludwig e Presidente do Hospital do Câncer pelas excelentes condições de trabalho.

Agradeço à Dra. Anamaria Camargo pela importante contribuição neste trabalho e pelas sugestões inteligentes dadas nos pareceres dos relatórios. E também a Fabrício Falconi Costa pela sua disponibilidade de me ajudar e de me indicar *papers*.

Agradeço especialmente aos amigos: Fabiana Bettoni não só pela enorme amizade, mas pelas idas de final de semana no Ludwig, mesmo que fosse só para me ajudar e pelas sugestões sempre sinceras; Raphael Bessa pelas opiniões e por sempre poder ensinar alguma coisa, seja sobre células ou correções de resumos e por ser meu eterno irmão e Lilian Campos por ter se juntado a nós no Ludwig, mantendo o convívio e amizade de outras épocas e ter me permitido ser “tia”.

Agradeço à Dra. Gisele Colleoni pela atenção e competência ao ler os meus relatórios.

Agradeço a Carlos Nascimento, Miyuki Silva e Severino Silva por cortarem as amostras com organização e rapidez.

Agradeço a todos os colegas do Instituto Ludwig, pelas grandes e pequenas ajudas no dia-a-dia e pelas amizades conquistadas, especialmente a Regina Nomizo com a cultura de células e a Roseli Mendonça pelos meios de cultura.

Agradeço às meninas da Pós-Graduação: Ana Maria Kuninari e Márcia Hiratani por sempre me ajudarem no que foi possível e pelo carinho.

Agradeço à toda a equipe da Biblioteca do Hospital do Câncer (Suely Francisco, Alessandra Francisco, Rosinéia Carneiro, Francyne Lima e Maria Adriana Bassols) por

sempre estarem dispostos a ajudar e pela competência e pelas correções feitas na bibliografia.

Agradeço ao Dr. Emmanuel Dias Neto por ter me apresentado para a Dra. Otávia.

Agradeço ao Dr. Ademar Lopes e ao Dr. Hirofumi Iyeyasu pela oportunidade de dar aulas.

Agradeço a Felipe Rodrigues da Silva pelo *Reference Manager* e suas explicações.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos concedida, a FAPESP pelo apoio financeiro através do CEPID e ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver o nosso projeto.

Agradeço a Banca Julgadora da Dissertação pelo tempo atribuído à leitura desta dissertação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à melhor mãe do mundo Beth Brait pelo amor, pela dedicação e por tudo o que ela faz por mim.

Agradeço ao meu pai Moracy Rodrigues de Oliveira pelo apoio incondicional e por ser o melhor Papai Sabe Tudo que eu poderia querer.

Agradeço à minha madrastra Rosemary Vernice da Silva por ser a melhor madrastra que alguém poderia ter, pela amizade e longas conversas.

Agradeço à minha avó torta Lydia Vernice da Silva pelo amor especial.

Agradeço à minha tia Zina e família pela preocupação, interesse no meu trabalho e carinho.

Agradeço às minhas tias Regina e Terezinha pela preocupação com o meu trabalho, por sempre estarem prontas a ajudar e pelo enorme amor.

Agradeço à minha avó Cida e Luizinho e família pelo carinho.

Agradeço às minhas amigas básicas Laís Miller e Ana Luisa Ornellas por me apoiarem, pela amizade gigante e eterna que nos une e por tornarem a minha vida melhor. Aos amigos de Botucatu, que estão perto ou longe, pelos bons tempos e pela amizade que continua e deixa a vida mais alegre.

Agradeço aos meus padrinhos Cecília e Dimas pela torcida e amizade, a Glorinha, Fiorin, Maria Adélia e Marisa pelo interesse e amizade e ao Dago por cuidar bem da minha mãe.

Agradeço ao Dunga por me acompanhar dormindo, atacando o *mouse* e pisando no teclado na fase de redação da tese e alegrar o meu dia-a-dia.

E a todos que deram a sua contribuição pequena ou grande para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

O câncer de bexiga é o quinto tipo de câncer mais incidente no mundo ocidental e as suas taxas de recidiva são altas. Os testes de detecção mais eficazes feitos atualmente são a cistoscopia (um método invasivo) e a citologia (apesar de não ser um método invasivo, a sua sensibilidade é baixa, principalmente em tumores superficiais). O silenciamento de genes devido à metilação de seus promotores parece ser uma via importante pela qual os tumores inativam os genes supressores de tumor. O desenvolvimento de marcadores moleculares para o câncer baseado na detecção de metilação anormal de promotores gênicos oferece uma abordagem promissora. Estudos recentes demonstraram que estas alterações podem ser detectadas tanto em amostras de tumores quanto em fluidos corpóreos. Para este estudo foram escolhidos 11 genes (*DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14*, *p16*, *RAR β* , *TIMP-3*, *14-3-3 σ* , *APC* e *H-CAD*), que já haviam sido descritos como frequentemente silenciados devido à metilação de seus promotores em outros tipos de tumores. O objetivo deste estudo foi investigar padrões de metilação destes genes em câncer de bexiga e correlacionar esses dados com parâmetros clínico-patológicos. Foi testada também a detecção de metilação em promotores gênicos em DNA extraídos de amostras de urina através de PCR específica para a detecção de metilação (MSP). Também buscou-se construir um modelo experimental para o estudo de hipermetilação por MSP em um promotor gênico nunca antes analisado. O padrão de metilação dos 11 genes foi determinada em 38 amostras de tumores de bexiga. Os DNAs foram extraídos de amostras emblocadas em parafina e submetidos à MSP. As frequências de metilação encontradas nos tumores foram de: 68,4% para o gene *14-3-3 σ* , 60,5% para o gene *RAR β* , 57,9% para o gene *APC*, 42,1% para o gene *E-CAD*, 13,2% para o gene *DAPK*, 10,5% para os genes *GSTP1*, *p14*, *p16* e *H-CAD*, 5,3% para o gene *MGMT* e 0% para o gene *TIMP-3*. A metilação do promotor do gene *E-CAD* foi correlacionada, com significância estatística, com a presença de metástases. A metilação do promotor do gene *APC* foi observada em tumores em estádios mais avançados. A metilação do promotor do gene *14-3-3 σ* foi associada com o estágio mais avançado T1 quando comparado ao estágio menos avançado Ta. A detecção de metilação em promotores gênicos em DNAs extraídos de amostras de urina através de MSP foi factível. Foram desenhados *primers* para detectar o perfil de metilação do gene *ADAM23* pela técnica de MSP e os resultados obtidos mostraram

que esse evento não é freqüente na carcinogênese de bexiga. Os resultados do presente trabalho sugerem que o perfil de metilação de determinados genes pode ser usado como marcador molecular em potencial para o câncer de bexiga. No entanto, estudos mais amplos são necessários para a confirmação dos achados deste trabalho.

SUMMARY

Bladder cancer is the fifth most common cancer in the Western World and its recurrence rates are high. The most used methods to detect and monitor bladder cancer are cystoscopy (an invasive procedure) and urine cytology (although it is a noninvasive method, its sensibility is low, especially for superficial tumors). Methylation-associated silencing of genes is considered as an important pathway to inactivate tumor suppressor genes in cancer. The development of tumor markers based on the detection of aberrant promoter methylation offers a potentially powerful approach for the detection of this disease. Recent studies demonstrated that these alterations could be detected not only in tumors, but also in bodily fluids. We selected 11 genes (*DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14*, *p16*, *RAR β* , *TIMP-3*, *14-3-3 σ* , *APC* e *H-CAD*), frequently silenced by aberrant methylation in many different tumor types, and investigated their aberrant methylation profile in bladder cancers. We tried to correlate our findings with clinicopathological parameters. We also investigated the feasibility of the detection of neoplastic cells in the urine using methylation analysis. We also aimed to determine an experimental model to detect the methylation status of a gene, which had never been analysed by the methylation specific PCR (MSP) before. The methylation status of the 11 selected genes was determined in 38 bladder cancer samples. DNA was extracted from formaline-fixed, paraffin-embedded sections and the DNA was subjected to MSP. Methylation frequencies of the tested genes were 68,4% for *14-3-3 σ* , 60,5% for *RAR β* , 57,9% for *APC*, 42,1% for *E-CAD*, 13,2% for *DAPK*, 10,5% for *GSTP1*, *p14*, *p16* and *H-CAD*, 5,3% *MGMT* for and 0% for *TIMP-3*. *E-CAD* promoter methylation was significantly correlated with the presence of metastasis. *APC* promoter methylation was observed in tumors in higher stages. *14-3-3 σ* promoter methylation was associated with the higher stage T1 when compared to the lower stage Ta. We were also able to detect the promoter methylation profile of the selected genes by analyzing urine samples. We designed primers to detect the promoter methylation status of the *ADAM23* gene by the MSP technique and these results showed that this event is not frequent in bladder cancer. The results presented here suggest that the methylation profile may be useful as a potential bladder cancer biomarker. Further studies are needed to confirm our findings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Neoplasias uroteliais de células transicionais da bexiga.	5
Figura 2	Perfil de metilação da região promotora dos genes <i>14-3-3σ</i> , <i>RARβ</i> , <i>APC</i> , <i>E-CAD</i> , <i>DAPK</i> , <i>GSTP1</i> , <i>HCAD</i> , <i>P14</i> , <i>P16</i> , <i>MGMT</i> e <i>TIMP3</i> em linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga..	42
Figura 3	Perfil de metilação da região promotora dos genes <i>RARβ</i> , <i>E-CAD</i> , <i>DAPK</i> , <i>GSTP1</i> , <i>P14</i> , <i>P16</i> , <i>MGMT</i> e <i>TIMP3</i> em linhagens celulares derivadas de diferentes tipos de câncer.	42
Figura 4	Perfil de metilação da região promotora dos genes <i>RARβ</i> , <i>E-CAD</i> , <i>DAPK</i> , <i>GSTP1</i> , <i>P14</i> , <i>P16</i> , <i>MGMT</i> e <i>TIMP3</i> em amostras tumorais de cada um dos trinta e oito pacientes incluídos neste estudo.	49
Figura 5	Perfil de metilação na região promotora dos genes <i>APC</i> , <i>RARβ</i> e <i>14-3-3σ</i> .	50
Figura 6	Relação entre o <i>status</i> de metilação do gene <i>E-CAD</i> e sobrevida livre de metástases dos pacientes portadores de câncer de bexiga.	54
Figura 7	Perfil de metilação e índice de metilação da região promotora dos genes <i>14-3-3σ</i> , <i>RARβ</i> , <i>APC</i> e <i>E-CAD</i> .	56
Figura 8	Perfil de metilação da região promotora dos genes <i>14-3-3σ</i> , <i>RARβ</i> , <i>APC</i> , <i>E-CAD</i> , <i>DAPK</i> , <i>GSTP1</i> , <i>HCAD</i> , <i>P14</i> , <i>P16</i> , <i>MGMT</i> e <i>TIMP3</i> em amostras de urina e de tumores.	58
Figura 9	Reação de PCR com <i>primers</i> intrônicos para o gene <i>hMLH-1</i> .	59
Figura 10	Reação de MSP com os <i>primers</i> para a situação metilada do gene <i>RARβ</i> nas diferentes diluições da linhagem celular T24 em 200mL de urina normal.	60
Figura 11	Mapa de metilação da ilha de CpG localizada na região promotora do gene <i>ADAM23</i> .	61

Figura 12 Ensaio de MSP para determinação do <i>status</i> de metilação do gene <i>ADAM23</i> em linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga	64
Figura 13 Ensaio de RT-PCR para verificar o nível de expressão do gene <i>ADAM23</i> .	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros clínico-patológicos das amostras tumorais.	45
Tabela 2	Frequência de metilação na região promotora dos 11 genes estudados em amostras tumorais.	48
Tabela 3	Associação da metilação dos genes <i>RARβ</i> e <i>14-3-3σ</i> com parâmetros clínico-patológicos.	52
Tabela 4	Associação da metilação dos genes <i>APC</i> e <i>E-CAD</i> com parâmetros clínico-patológicos.	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na MSP.	31
Quadro 2	Condições padronizadas para a MSP.	40

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Bexiga	1
1.2	Marcadores Moleculares e Metilação	9
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3.	MATERIAS E MÉTODOS	23
3.1	Linhagens Celulares	23
3.2	Amostras de Tumores	23
3.3	Amostras de Urina	24
3.4	Extração de DNA	25
3.5	Tratamento com Bissulfito de Sódio	26
3.6	Reação de PCR	28
3.7	Pesquisa de Células Neoplásicas na Urina Usando MSP	32
3.8	Clonagem e Seqüenciamento	33
3.9	Extração de RNA	34
3.10	RT-PCR	35
3.11	Desenho dos <i>primers</i> para MSP	36
3.12	Análise Estatística	37
4.	RESULTADOS	38
4.1	Padronização das Condições da Amplificação	38
4.2	Padrão de Metilação em Linhagens Celulares	40

4.3	Amostras de Tumores	43
4.4	Perfil de Metilação dos Tumores Estudados	47
4.5	Correlação entre os Dados Clínico-Patológicos e o Perfil de Metilação dos Tumores Estudados	51
4.6	Índice de Metilação	55
4.7	Amostras de Urinas	57
4.8	Perfil de Metilação da Região Promotora do Gene <i>ADAM23</i>	61
5.	DISCUSSÃO	66
6.	CONCLUSÕES	84
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga é o quinto tipo de câncer mais incidente no mundo ocidental (DOMINGUEZ et al. 2002; MARUYAMA et al. 2001) e é o segundo a acometer o trato urogenital (superado apenas pelo câncer de próstata). Ele é uma das doenças urológicas mais comuns e compreende um amplo espectro de tumores que variam no seu potencial biológico de progressão e de desenvolvimento de metástases.

A incidência do câncer de bexiga vem aumentando nos últimos anos nos países desenvolvidos. Aproximadamente, cinquenta e três mil novos casos de câncer de bexiga, foram diagnosticados no ano de 2000 nos Estados Unidos (MARUYAMA et al. 2001). No Brasil, segundo os índices do Ministério da Saúde, ele se encontra entre os dez de maior incidência no país. Foi estimado o aparecimento de sete mil quinhentos e cinquenta casos novos de câncer de bexiga no Brasil para o ano de 1999, segundo dados do INCA (<http://www.inca.com.br>). No município de São Paulo no ano de 1998, houve setecentos e setenta e oito casos diagnosticados em homens e duzentos e setenta em mulheres (MIRRA et al. 2001).

No que diz respeito à sua incidência, é maior em homens que em mulheres, com uma proporção aproximada de 3:1; maior em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento; maior em áreas urbanas do que em áreas rurais. Acrescenta-se a isso o fato de que 80% dos pacientes têm acima de 59 anos de idade.

Fatores ambientais parecem ter um papel significativo na carcinogênese do câncer de bexiga (JUNG e MESSING 2000). O fator de risco considerado mais importante é o tabaco, podendo variar de três a sete vezes, dependendo da quantidade de cigarros fumados por dia e dos hábitos do fumante. Sendo que de 50 a 80% das neoplasias de bexiga em homens podem ser atribuídas ao uso de cigarro. Cerca de 20% das neoplasias de bexiga são atribuídas a fatores ocupacionais, como a exposição industrial às arilaminas, substâncias encontradas em fábricas de borracha e de tingimento (nestes casos o aparecimento do câncer ocorre no prazo de quinze a vinte anos após a primeira exposição). Outros fatores importantes (principalmente em carcinomas de células transicionais, que são os mais freqüentes) são: infestações por *Schistosoma haematobium* (seus ovos são depositados na parede vesical e desencadeiam uma resposta inflamatória crônica exuberante que induz metaplasia e displasia escamosa progressivas da mucosa e, em alguns casos, neoplasias); cistite crônica (a irritação crônica pode resultar em metaplasia e displasia e finalmente em neoplasia); exposição maciça à ciclofosfamida (imunossupressor que pode aumentar em até dez vezes o risco de câncer vesical em doze anos de exposição) e radioterapia na região pélvica, por exemplo contra carcinomas de ovário e próstata (o aparecimento do câncer ocorre no prazo de cinco a dez anos após a exposição à radiação e dependendo da dose administrada, há um risco aumentado de uma a quatro vezes do aparecimento de recidiva). Há também alguns fatores candidatos, com os quais ainda não foi feita uma associação completa, mas que parecem ter relação com o aparecimento desse tipo de câncer e que podem assim ser identificados: consumo excessivo de cafeína, uso por longo prazo de adoçantes

sintéticos e consumo crônico de álcool. Não há relações bem estabelecidas para fatores hereditários nesse tipo de câncer.

Em 1998, a Organização Mundial da Saúde e a Sociedade Internacional de Patologia Urológica publicaram um consenso sobre a classificação das Neoplasias Uroteliais (de células transicionais) da Bexiga urinária (EPSTEIN et al. 1998). Essa classificação buscou uniformizar as terminologias e as principais características dos diferentes tipos de câncer de bexiga. Não sendo definitiva, tem o intuito de servir como base para estudos futuros que possibilitem seu refinamento, além de auxiliar em uma melhor correlação destas lesões com seu comportamento biológico. As classificações mais importantes para o presente trabalho foram: Neoplasia Urotelial Papilar de Baixo Potencial Maligno (NUPBPM), Carcinoma Urotelial Papilar de Baixo Grau (CUPBG) (Figura 1A), Carcinoma Urotelial Papilar de Alto Grau (CUPAG) (Figura 1B) e Carcinoma Urotelial Invasor (CUI) (Figura 1C).

A Neoplasia Urotelial de baixo potencial maligno é uma lesão urotelial que apresenta uma organização ordenada dentro da papila com poucas anormalidades de arquitetura e mínimas atipias nucleares. O urotélio exibe aumento da espessura, e as células apresentam núcleos com discreto aumento do volume e raras mitoses. Essa lesão não é associada com invasão ou metástases, salvo em raros casos. No entanto, é uma lesão clinicamente importante porque esses pacientes têm risco aumentado de desenvolvimento de recidiva ou novas lesões papilares, que podem ser de maior grau, com maior risco de progressão para neoplasia invasora.

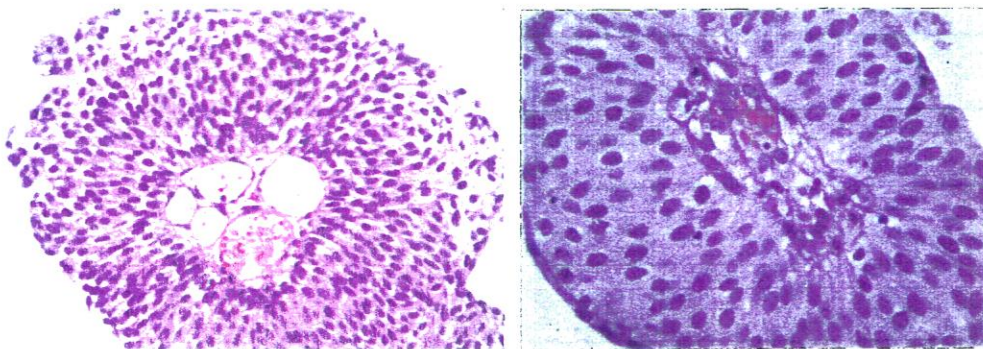
O carcinoma urotelial papilar de baixo grau (Figura 1A) é caracterizado por uma aparência global ordenada do urotélio, mas com variação arquitetural e/ou citológica facilmente reconhecível. Variações de polaridade e tamanho nuclear e

forma e padrão de cromatina são discretas mas definitivamente presentes. As células apresentam um aspecto muito mais neoplásico do que no tipo anterior. Os pacientes freqüentemente apresentam recidivas. Esse tipo de tumor pode invadir a lâmina própria e tem 5% de chance de progressão.

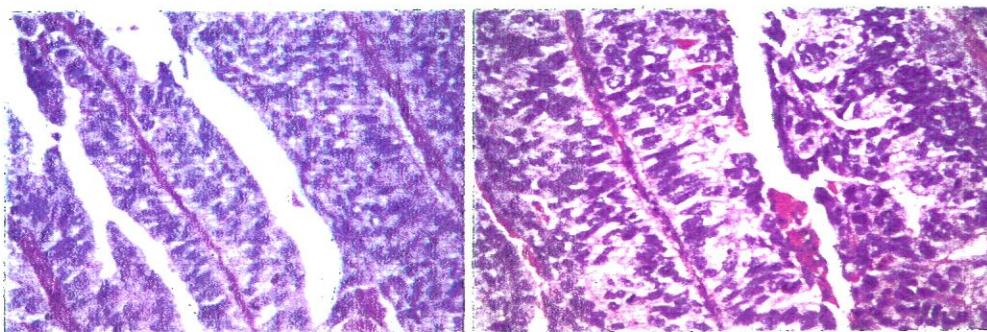
O carcinoma urotelial papilar de alto grau (Figura 1B) é caracterizado por uma aparência predominante ou totalmente desorganizada, com anormalidades arquiteturais e citológicas. No que diz respeito à arquitetura, as células se agrupam irregularmente e o epitélio tem um aspecto desorganizado. Citologicamente, o pleomorfismo nuclear varia de moderado a acentuado, a cromatina é grosseira e nucléolos proeminentes são observados. Há também aumento no número de mitoses, incluindo formas atípicas. Esse tipo de tumor apresenta riscos de progressão de 15 a 40% e também um alto risco de associação com doença invasiva.

O carcinoma urotelial invasor (Figura 1C) compreende diferentes níveis de invasão, ele representa uma doença bastante avançada, a qual confere um pior prognóstico aos pacientes, a profundidade da invasão é decisiva para a escolha do tratamento e determinação do prognóstico. Pode haver invasão da lâmina própria (uma camada de tecido conjuntivo localizada abaixo do epitélio), que é caracterizada pela presença de agrupamentos de células cancerosas ou de células isoladas nesta camada. E mais profundamente pode ocorrer a invasão da muscular própria ou músculo detrusor (uma parede muscular), que é caracterizada pela infiltração do tumor nessa camada muscular.

A.



B.



C.

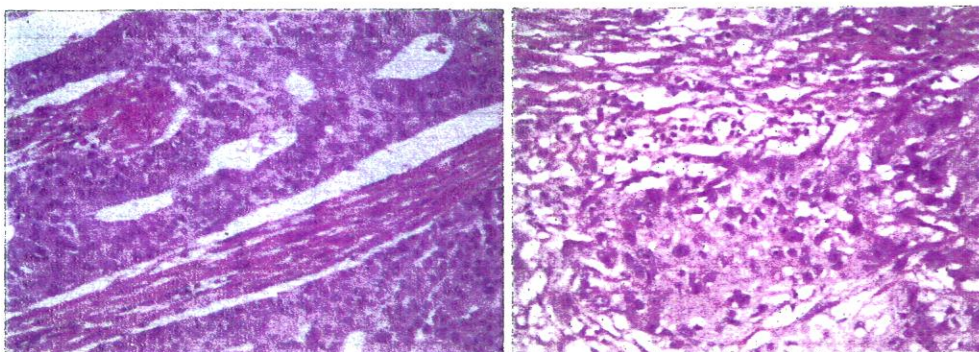


Figura 1 - Neoplasias uroteliais de células transicionais da bexiga. A. Carcinoma urotelial papilar de baixo grau. (Aumentos de 40X e 200X) B. Carcinoma urotelial papilar de alto grau. (Aumentos de 100X e 200X) C. Carcinoma urotelial invasor. (Aumentos de 100X e 200X)

O câncer de bexiga apresenta comportamento imprevisível em pelo menos 30% dos casos. Uma de suas características marcantes é a freqüente taxa de recidivas, na maioria das vezes, em curtos espaços de tempo. A capacidade de prever o curso da doença (ou seja, a individualização do prognóstico) e a sua detecção precoce são fatores decisivos para o controle dessa patologia e para uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

Atualmente, o tratamento do tumor primário deve levar em consideração características intrínsecas do tumor, tais como o estadiamento, a profundidade de invasão, a extensão do acometimento vesical, a história pregressa de tumores vesicais e o grau de indiferenciação celular. Características clínicas do paciente como idade, estado geral, co-morbidades e preferências pessoais podem ser importantes na decisão terapêutica. É através da avaliação cuidadosa desses fatores que se decide por uma modalidade terapêutica isolada ou combinada para cada paciente. Nesse sentido, fatores prognósticos com maior sensibilidade e especificidade poderiam oferecer subsídios mais confiáveis para as decisões clínicas.

Todos os cânceres de células transicionais, que compreendem 90% das neoplasias de bexiga, apresentam uma alta tendência à recidiva. São exemplos ilustrativos: carcinomas de células uroteliais superficiais, caracterizados pelo risco de 60 a 85% de recorrência, com maior incidência no primeiro ano descritas por EPSTEIN et al. (1998) e VRIESEMA et al. (2000), e 10 a 30% de risco de progressão para tumores invasivos por JUNG e MESSING (2000), os carcinomas papilares de grau I, dos quais 60% recidivam e também as lesões em grau III que por volta de 85% apresentam recidivas. Em termos de morbidade e mortalidade, as neoplasias de bexiga mostram índices altos. Por exemplo, apenas 30% das neoplasias

de grau III apresentam sobrevida de dez anos e 70% dos pacientes portadores de carcinomas de células escamosas falecem no período de um ano. Portanto, os controles periódicos são necessários para que sejam detectados novos focos de câncer ainda em estágios iniciais.

Os testes de detecção mais eficazes feitos atualmente são predominantemente invasivos (cistoscopia e biópsia) e o desconforto e o alto custo desses exames dificultam um acompanhamento continuado e freqüente dos pacientes. Essas técnicas apresentam muita dificuldade na identificação de lesões pré-neoplásicas, de carcinomas *in situ* sem grandes evidências macroscópicas e de lesões papilares pequenas. Além do alto custo e de ser um método invasivo, a cistoscopia apresenta riscos de 7 a 15% de infecção do trato urinário. A citologia, por sua vez, apesar de ser um método não invasivo e apresentar alta especificidade, apresenta baixa sensibilidade e pouca reprodutibilidade.

Devido à insatisfação diante dos métodos atuais de diagnóstico, têm sido utilizada a presença de diferentes marcadores no soro e na urina como fator de diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de câncer de bexiga, principalmente no caso de tumores superficiais. Eles incluem citoqueratinas, proteínas nucleares de matriz, ácido hialurônico e E-caderina solúvel. Dos marcadores citados, há alguns que vêm sendo bastante utilizados, no entanto, a sensibilidade e a especificidade apresentadas são extremamente baixas em tumores precoces (EPSTEIN et al. 1998). Portanto, há uma busca intensa para a obtenção de testes capazes de detectar a presença do câncer de bexiga de maneira eficiente e não invasiva. Exemplo dessa busca são os testes capazes de detectar a presença de células

neoplásicas na urina, os quais facilitariam a detecção precoce e o acompanhamento freqüente da doença nos pacientes.

Por tudo isso, pode-se concluir que os métodos de exame mais eficazes atualmente são invasivos, representando sérias dificuldades de aceitação por parte dos pacientes, fator que impede o acompanhamento freqüente. Considerando-se a cistoscopia, por exemplo, a realização periódica de exames de acompanhamento esbarra, principalmente, nas queixas mais comuns de pacientes submetidos a esse procedimento: dor, hematúria, constante anseio de urinar e infecção do trato urinário, dentre outros (VRIESEMA et al. 2000). Assim sendo, por esses motivos e também pelas baixas sensibilidade e especificidade dos testes atuais, é muito difícil que se detecte tumores em baixos graus de desenvolvimento.

A caracterização de grupos riscos e a detecção precoce da doença poderiam melhorar a sobrevida global da população que sofre de câncer de bexiga. Para que isso aconteça, há absoluta necessidade de identificação de fatores prognósticos mais eficazes para o câncer superficial de bexiga, o que permitiria a escolha da terapia mais adequada e eficaz para cada tumor. Como consequência da identificação de marcadores prognósticos mais eficazes, uma fração significativa dos pacientes se beneficiaria da individualização do tratamento. Sendo possível estabelecer controles de acompanhamento freqüentes nos pacientes e identificar tumores em estágios precoces, a escolha do tratamento seria facilitada e poderia diminuir a agressividade do quadro de evolução clínica. Seletivamente, poderiam ser aplicadas terapias radicais mais precoces, ajustadas às características moleculares dos tumores mais agressivos e, também, terapias mais brandas poderiam ser instituídas aos pacientes com características moleculares favoráveis, ou seja, de bom prognóstico, mesmo que

apresentassem características clínicas e histopatológicas agressivas. Os resultados do tratamento mais individualizado, portanto, poderiam gerar maiores sobrevidas e melhor qualidade de vida para os pacientes.

1.2 MARCADORES MOLECULARES E METILAÇÃO

Muitos estudos têm procurado determinar características moleculares do câncer de bexiga. Elas compreendem deleções no cromossomo 9, que podem ocorrer em mais de 60% das neoplasias de bexiga e parecem ser eventos precoces; mutações em genes supressores de tumor como no gene *Rb* (gene do Retinoblastoma), identificadas em cerca de 30% dos casos e no gene *P53* que ocorre em mais de 50% dos carcinomas de células transicionais. Outras alterações moleculares associadas ao câncer de bexiga incluem a deleção e perda de expressão do gene *PI6*; instabilidades de microsátélites; expressão aumentada do oncogene *c-erb-B2*; mutações no oncogene *H-ras*, identificada em mais de 35% dos tumores de bexiga; expressões anormais de receptores de fatores de crescimento no urotélio de pacientes com carcinoma de células transicionais; expressão reduzida da molécula de adesão E-caderina; neoangiogênese; entre outros (JUNG e MESSING 2000).

Como a carcinogênese é um processo de múltiplos passos que é acompanhado de um acúmulo de alterações genéticas, as células neoplásicas apresentam características exclusivas ou mais freqüentemente encontradas nelas do que em células normais. Essas características podem ser usadas como marcadores moleculares com capacidade de diferenciar a célula alterada da normal. Atualmente, a identificação de marcadores moleculares eficazes para o diagnóstico da doença é

uma das mais promissoras áreas de pesquisa em câncer. Esses marcadores podem ser importantes na detecção da doença em estágios precoces, uma vez que nesta fase a doença é mais passível de cura. Também podem ser úteis no acompanhamento de pacientes, denunciando a recidiva da doença ou o seu desaparecimento. Os testes de identificação destes marcadores devem apresentar alta sensibilidade e especificidade. Sensibilidade se refere à frequência em que o teste identifica o câncer quando ele está presente e especificidade se refere à frequência em que o teste detecta corretamente o câncer (SIDRANSKY 1997).

Fatores epigenéticos são aqueles que alteram o fenótipo sem alterar o genótipo, ou seja, não representam alterações na sequência de DNA. Eles são herdáveis durante a divisão celular (FEINBERG 2001). A metilação é um mecanismo epigenético muito importante para o desenvolvimento dos mamíferos (JONES e TAKAI 2001), uma vez que ela pode ocorrer em locais pré-determinados como no caso do *imprinting* genômico, mecanismo que ocorre em genes específicos em que um dos alelos herdados dos pais é sempre inativado epigeneticamente de acordo com a sua origem parental. Esse é um mecanismo essencial para embriogênese (FALLS et al. 1999).

A metilação é um processo biológico que consiste na adição de um radical metil (CH_3) principalmente nas bases nitrogenadas citosinas (C) que estão localizadas a 5' de guaninas (G). Sequências repetitivas do dinucleotídeo CG presentes principalmente em regiões promotoras dos genes recebem a denominação de ilhas de CpG (HABUCHI et al. 2001). O critério para determinar se uma região é uma ilha de CpG é que ela seja maior que 200bp, tenha um conteúdo de C somado a G maior que 50% e que a proporção entre CG e GC seja maior que 60% (TOYOTA

et al. 1999). A metilação é um mecanismo poderoso para supressão de expressão gênica (JONES e LAIRD 1999).

As enzimas que transferem o radical metil para a citosina são as DNA metiltransferases (DNMT). O alvo dessas enzimas é o dinucleotídeo CG. Ortólogos dessas enzimas não foram encontrados em organismos que não apresentam metilação como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. A metiltransferase de mamíferos, Dnmt1, tem alta afinidade por substratos hemimetilados, mas também é capaz de atuar na metilação de substratos não metilados, ou seja, metilação *de novo*. Essas atividades são desencadeadas por estruturas aberrantes de DNA, interações proteína-proteína e resíduos de citosinas metiladas presentes no DNA substrato. Os efeitos causados pela metilação de citosinas nas regiões promotoras sugerem que este mecanismo inibe a transcrição gênica impedindo o seu início. Três possíveis mecanismos foram propostos para o efeito de repressão transcricional devido à metilação do DNA. O primeiro mecanismo envolve a interferência direta na ligação de fatores de transcrição aos seus locais de reconhecimento nos promotores gênicos, como se a presença do radical metil na sequência impedisse os fatores de transcrição de se ligarem aos seus sítios específicos. Já foi mostrado que a metilação do DNA reduz a afinidade de ligação dos fatores de transcrição às suas sequências alvo (JONES e LAIRD 1999). O segundo mecanismo em potencial seria através da ligação de repressores transcricionais específicos ao DNA metilado. O terceiro possível mecanismo pelo qual a metilação poderia reprimir a transcrição é pela alteração da estrutura da cromatina (SINGAL e GINDER 1999). Há um grupo de proteínas conhecidas como proteínas com domínio de ligação ao CpG metilado (MBD), que se ligam

preferencialmente aos dinucleotídeos CG metilados. Essas proteínas reprimem a transcrição parcialmente através da ação de deacetilases de histonas (HDAC), enzimas que removem o grupo acetil das histonas permitindo assim, uma compactação da cromatina (ROUNTREE et al. 2001). Tem sido estudada a associação entre a atividade da maquinaria de metilação considerando a ação das proteínas da família das DNTM e das MBD com outro mecanismo epigenético: a acetilação de histonas considerando a ação das HDAC, criando uma cooperação desses mecanismos no silenciamento da transcrição de determinados genes.

O estabelecimento e manutenção dos padrões de metilação de uma determinada sequência são feitos pelas DNMT. A replicação de uma sequência metilada gera uma sequência hemimetilada, pois uma fita permanece metilada enquanto a fita recém sintetizada não está metilada. As enzimas DNTM adicionam um radical metil no dinucleotídeo CG complementar ao dinucleotídeo metilado da fita mãe (PLASS e SOLOWAY 2002).

Freqüentemente em tumores, tem sido observada a metilação em locais normalmente não metilados em células normais, como em regiões promotoras, impedindo a transcrição de determinados tipos de genes. A metilação ocorre principalmente em promotores de genes que participam da supressão tumoral: genes supressores tumorais, envolvidos no sistema de reparo de DNA, no ciclo e morte celulares e genes que bloqueariam metástase, como os envolvidos em adesão celular.

A hipótese de Knudson de que dois eventos são necessários para a completa inativação de um gene supressor de tumor é fundamental na compreensão da carcinogênese. Os dois eventos pelos quais os genes supressores de tumor são reprimidos são mutação e perda de material cromossômico. No entanto, o fato de a

metilação de ilhas de CpG localizadas em promotores gênicos poder causar silenciamento da transcrição, somada à observação de padrões alterados de metilação em células cancerosas, pode sugerir que esta seria uma via em potencial a ser acrescentada na teoria de Knudson para inativação de genes supressores de tumores (JONES e LAIRD 1999).

Embora ainda não esteja completamente estabelecido se a metilação de promotores gênicos é um evento precoce na carcinogênese, há evidências de sua ocorrência em estágios iniciais da formação dos tumores. Por exemplo, a maioria dos carcinomas colorretais esporádicos deficientes em genes de reparo de DNA que apresentam instabilidades de microssatélites, apresentam hipermetilação da região promotora do gene de reparo de DNA *hMLH1* e também já foi documentada a hipermetilação de gene *Rb1* (gene do retinoblastoma 1) em retinoblastomas unilaterais e como a alteração desse gene é considerada causativa da doença, a metilação está certamente ligada a estágios precoces da tumorigênese (JONES e LAIRD 1999).

A ocorrência de metilação anormal ou hipermetilação tem sido considerada como um marcador em potencial para o câncer (HERMAN et al. 1998; ESTELLER et al. 1999; JONES e LAIRD 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000). Como a detecção de um marcador deve ocorrer, de preferência em um exame simples, estudos também analisando fluídos corpóreos têm sido feitos (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; PALMISANO et al. 2000; ROSAS et al. 2001).

O estabelecimento do método de PCR específica para a detecção de metilação (MSP - *methylation specific PCR*) (HERMAN et al. 1996) facilitou o estudo de metilação nas regiões promotoras de genes alvos em diversos tipos de tumores, pois

permitiu a análise de um maior número de amostras em um menor espaço de tempo e menor custo quando comparado ao método de seqüenciamento, por exemplo. A técnica é baseada em um primeiro passo no qual o DNA é submetido a um tratamento com bissulfito de sódio. Este tratamento converte as citosinas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. No momento da reação de amplificação as uracilas são convertidas em timinas. Na amplificação por MSP há dois diferentes pares de *primers*, cada par reconhece especificamente as seqüências metiladas (com as citosinas mantidas) ou as seqüências não metiladas (com timinas nos lugares das citosinas). O desenho dos *primers* é uma etapa importante, pois a confiabilidade desse método depende da escolha de regiões do promotor que contenham ilhas de CpG e que possam ser reconhecidas pelos *primers* quando estiverem metiladas.

Um exemplo de trabalho que utilizou MSP é o de ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. (2001) que estudaram a metilação nos promotores dos genes *RARβ*, *ECAD*, *DAPK*, *GSTP1*, *P14*, *P16*, *MGMT* e *TIMP-3* em tumores de pulmão de não pequenas células e correlacionaram os achados moleculares com parâmetros clínico-patológicos. Eles analisaram cento e sete amostras de tumores primários e cento e quatro amostras normais correspondentes e estabeleceram frequências de 40% para o gene *RARβ*, de 26% para o gene *TIMP-3*, de 25% para o gene *P16*, de 21% para o gene *MGMT*, de 19% para o gene *DAPK*, de 18% para o gene *ECAD*, de 8% para o gene *P14* e de 7% para o gene *GSTP1*. 82% dos pacientes mostraram metilação em pelo menos um dos genes do painel estudado. Houve a correlação estatisticamente significativa entre sobrevida global mais longa e metilação no promotor do gene *E-CAD*. Como conclusão, mostraram que a metilação é um evento freqüente nesse tipo

de tumor e sugerem que mais estudos precisam ser feitos para o estabelecimento de correlações desses achados moleculares com parâmetros clínico-patológicos.

Já é sabido que células neoplásicas se desprendem do tumor de bexiga e são liberadas na urina (SIDRANSKY 2002), portanto, a identificação de marcadores moleculares presentes nessas células facilitará a detecção do câncer de bexiga através de um simples exame de urina. Por isso é importante o estudo da metilação de regiões promotoras de genes alvos como marcadores moleculares em potencial para o câncer de bexiga e a padronização da sua detecção na urina.

Recentemente foram publicados trabalhos que avaliaram o papel da hipermetilação da região promotora de um painel de genes em câncer de bexiga. MARUYAMA et al. (2001) analisaram o perfil de metilação nas regiões promotoras de um painel de dez genes (*RASSF1A*, *RAR β* , *APC*, *P 16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD*, *H-CAD* e *FHIT*) e estabeleceram uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *E-CAD* metilado e uma menor sobrevida. CHAN et al. (2002) analisaram um painel de sete genes (*RAR β* , *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD* e *P15*) em tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras de urinas correspondentes aos tumores e demonstraram que a detecção pela urina é factível e, de acordo com os resultados obtidos, essa detecção é mais sensível do que a citologia convencional. Comparando a hipermetilação da região promotora do gene *P14* em amostras de tumores e de DNA de plasma correspondentes, DOMINGUEZ et al. (2002) encontraram 87% de concordância e estabeleceram uma correlação significativa entre a metilação de *P14* e a presença de focos multicêntricos, tumores maiores e recidivas. Em outro estudo, TADA et al. (2002) analisaram a hipermetilação da região promotora de um painel

de sete genes (*hMLH1*, *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD* e *VHL*) e demonstraram existir uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *DAPK* hipermetilado e maior frequência de recidiva

A escolha dos doze genes utilizados neste trabalho se baseou em dados da literatura que sugeriam que a metilação da região promotora destes genes, seja em tumores de bexiga ou em outros tipos de tumores. Os genes escolhidos apresentam características que correspondem à idéia de hipermetilação em genes envolvidos na supressão tumoral, sendo que para todos já existem estudos relacionando o seu silenciamento com a hipermetilação das suas regiões promotoras em outros tipos de tumores. Os genes estudados nesse trabalho foram:

- *14-3-3 σ* : este gene codifica uma proteína conhecida como estratifina, reguladora de senescência de células epiteliais e que tem funções de controle no ciclo celular, parece estar envolvida em regulação do crescimento celular, diferenciação e transdução de sinal (SUZUKI et al. 2000). A perda da sua expressão sensibiliza as células a irradiação gama e a agentes quimioterapêuticos, exibindo anormalidades cromossômicas (GASCO et al. 2002a). As células também perdem a capacidade da sua permanência na fase G2 do ciclo celular (GASCO et al. 2002b). Essas características são consistentes com a idéia de gene supressor de tumor. A hipermetilação da região promotora deste gene já foi estudada em câncer de mama por FERGUSON et al. (2000) e UMBRICHT et al. (2001), câncer gástrico (SUZUKI et al. 2000), câncer de vulva (GASCO et al. 2002b) e câncer oral (GASCO et al. 2002a);

- *RAR β* (Receptor de ácido retinóico β): membro da superfamília de receptores de hormônios esteróides, pode ativar a maquinaria de transcrição e pode regular a expressão de genes alvos. A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de pulmão, de colon, de mama (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001) e de bexiga (MARUYAMA et al. 2001; CHAN et al. 2002);
- *APC* (gene da polipose adenomatosa de colon) : gene supressor de tumor cuja perda das funções parece estar relacionada a perda de controle da proliferação celular (TSUCHIYA et al. 2000), o que é uma característica importante na proliferação de células neoplásicas, ele também apresenta a capacidade de ativar a maquinaria de transcrição. A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores colorretais, gástricos (TSUCHIYA et al. 2000) e de bexiga (MARUYAMA et al. 2001);
- *E-CAD* (caderina E): glicoproteína transmembrana que modula a adesão intercelular dependente de cálcio, a perda da sua expressão parece estar relacionada com propriedades invasivas e metastáticas das células neoplásicas, o que é consistente com a idéia de gene supressor de tumor (KOIZUME et al. 2002). A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de pulmão, de mama, de próstata (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001) e de bexiga (MARUYAMA et al. 2001; CHAN et al. 2002; TADA et al. 2002);
- *DAPK*: proteína quinase (serina/treonina) regulada por cálcio associada com morte celular, estando envolvida principalmente na

apoptose induzida por IFN- γ (interferon gama), mas também participa da apoptose induzida por outros ligantes como por exemplo TNF α (fator de necrose tumoral alfa) e a via apoptótica dependente de *p53*. A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de pulmão (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001) e de bexiga (CHAN et al. 2002; MARUYAMA et al. 2001; TADA et al. 2002);

- *GSTP1* (glutathione S-transferase 1): codifica uma proteína que pertence à super família de enzimas GSTs, envolvidas na detoxificação de compostos eletrofilicos (como carcinógenos e drogas citotóxicas) por conjugação de glutathione. Também acredita-se que essas enzimas tenham um papel importante na proteção do DNA a danos oxidativos (JERÓNIMO et al. 2002). A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de próstata (CAIRNS et al. 2001; JERÓNIMO et al. 2002), de pulmão (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001) e de bexiga (MARUYAMA et al. 2001; CHAN et al. 2002; TADA et al. 2002);
- *H-CAD* (caderina H): codifica uma glicoproteína de membrana de reconhecimento celular e adesão. A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de mama, de pulmão (TOYOOKA et al. 2002) e de bexiga (MARUYAMA et al. 2001);
- *P14*: tem papel na regulação do ciclo celular, é capaz de parar o ciclo em G1 ou G2 e auxilia na regulação da localização nuclear de *p53*. A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de

pulmão, tumores colorretais (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001), em glioblastomas e tumores de bexiga (DOMINGUEZ et al. 2002);

- *P16*: gene supressor de tumor, tem um papel chave na regulação do ciclo celular, tem a capacidade de inibir a quinases dependentes de ciclinas, bloqueando a fosforilação de *RBI*, impedindo assim que as células saiam da fase G1 do ciclo celular. A hipermetilação de seu promotor já foi estudada em tumores de pulmão (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001) e tumores de bexiga (MARUYAMA et al. 2001; CHAN et al. 2002; TADA et al. 2002; DOMINGUEZ et al. 2002);
- *MGMT* (O^6 -metilguanina-DNA-metiltransferase): codifica uma enzima de reparo de DNA que protege as células de efeitos carcinogênicos de alquilantes, corrigindo as mutações causadas por estes carcinógenos. Tumores que apresentam esse gene silenciado parecem ser predispostos a terem mutações em genes chaves como *p53* e *ras*. A hipermetilação da região promotora desse gene já foi estudada em alguns tipos de tumores como de pulmão (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001), tumores colorretais (ESTELLER et al. 2000b) e tumores de bexiga (MARUYAMA et al. 2001; CHAN et al. 2002; TADA et al. 2002);
- *TIMP-3* (inibidor tecidual de metaloprotease 3): esse gene inibe a ação das metaloproteases, as quais são capazes de degradar colágeno amorfo e fibronectina. A hipermetilação de seu promotor já foi

estudada em tumores de pulmão (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001).

Levantando a hipótese da utilização da hipermetilação de promotores de genes alvos como potenciais marcadores moleculares para o câncer de bexiga, o presente trabalho buscou encontrar possíveis marcadores moleculares para diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores desse tipo de câncer através da avaliação da frequência da hipermetilação da região promotora de onze genes selecionados. Adicionalmente, o presente estudo também buscou estabelecer a técnica de MSP, desenvolvendo *primers* para a região promotora de um gene para a detecção de metilação, no qual este tipo de técnica jamais havia sido utilizada. O gene escolhido foi o gene *ADAM23* (*a desintegrin and metalloprotease*), o qual codifica uma molécula com atividades de adesão e proteolítica (CAL et al. 2000), pelas evidências de COSTA et al. (manuscrito em preparação) (COSTA et al. 2003), que mostraram a presença de metilação na região promotora do gene *ADAM23* em tumores e linhagem celulares derivadas de câncer de mama. As moléculas de adesão parecem ter um papel importante na supressão tumoral, pois a perda da sua expressão pode estar ligada à facilitação da migração de células neoplásicas para novos focos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho busca estabelecer a frequência, em câncer de bexiga, da hipermetilação de regiões promotoras de genes alvos, avaliando esta alteração como possível marcador molecular para diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores desta neoplasia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho são:

- 1) Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *RARβ*, *TIMP-3*, *14-3-3σ*, *APC* e *H-CAD* em linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga;
- 2) Determinar as frequências de metilação da região promotora dos genes *DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *RARβ*, *TIMP-3*, *14-3-3σ*, *APC* e *H-CAD* em tumores de bexiga provenientes do Arquivo do Hospital A. C. Camargo – SP;

- 3) Correlacionar os dados clínico-patológicos dos pacientes com os padrões de metilação das regiões promotoras dos genes estudados;
- 4) Padronizar um teste para a detecção da hipermetilação das regiões promotoras desse genes em amostras de urina, visando ao desenvolvimento de um possível método de diagnóstico e acompanhamento de pacientes com câncer de bexiga.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

Cinco linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga: HT-1376, J82, SW780 e T24 (derivadas de carcinoma de células transicionais da bexiga) e SCABER (derivada de carcinoma de células escamosas) foram utilizadas neste trabalho. Outras sete linhagens celulares derivadas de outros tipos de câncer também foram utilizadas: HCT 116 (derivada de carcinoma colorretal), DLD-1, SW480, HT 29 (derivadas de adenocarcinoma colorretal), Du 145 (derivadas de células indiferenciadas de metástase cerebral de carcinoma de próstata), H 1299 (derivadas de carcinoma de células não pequenas de pulmão) e MCF-7 (derivadas de adenocarcinoma de mama). Todas as linhagens celulares são provenientes da ATCC-American Type Culture Collection (<http://www.atcc.org/>).

3.2 AMOSTRAS DE TUMORES

As 38 amostras de tumores emblocadas em parafina são provenientes do arquivo do Hospital do Câncer AC Camargo - SP. Foi feita uma busca de duzentos casos seqüenciais diagnosticados como câncer de bexiga no período de 1990 a 1993, para permitir a posterior correlação dos achados moleculares com as dados clínico-patológicos. As lâminas coradas por hematoxilina-eosina foram analisadas por dois patologistas (Prof^o Dr. Fernando Soares e Dr. Antonio Hugo Campos) para

confirmação de diagnóstico, estadiamento do tumor e determinação das áreas que correspondem a tecido tumoral, a fim de selecionar estas áreas para a extração de DNA com a menor proporção possível de tecido normal. Após essa determinação, os blocos correspondentes às lâminas foram cortados e o DNA foi extraído.

Os tipos histológicos mais freqüentemente diagnosticados pelos patologistas foram: neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno, carcinoma urotelial papilar de baixo grau, carcinoma urotelial papilar de alto grau e carcinoma urotelial invasor (segundo a classificação de EPSTEIN et al. de 1998).

3.3 AMOSTRAS DE URINA

Havia armazenado no Instituto Ludwig de pesquisa sobre o Câncer – São Paulo, RNAs extraídos de urina de pacientes portadores de câncer de bexiga, provenientes de um trabalho anterior em colaboração com Prof^o Dr. Álvaro Sarkis, do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer. Para verificar a presença de DNA nessas amostras, realizamos uma reação de PCR utilizando *primers* (direto: 5'-TTGTGTCTCTAGTTCTGG-3' e reverso: 5'-CATTGTTGTAGTAGCTCTGC-3') desenhados nos íntrons 12 e 13 do gene *hMLH1* (*humam mut-L homologue 1*). Com o uso desses primers intrônicos, a presença de amplificação significa que DNA genômico está presente na amostra. As seguintes condições de reação foram utilizadas: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2μM de dNTPs, 0,3μM de cada primer, 1X tampão de reação da enzima *AmpliTaq GOLD*, 1,5u *AmpliTaq GOLD* (*Applied Biosystems*). As condições de amplificação foram de dez minutos iniciais a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaq GOLD*, dez ciclos de trinta segundos a 95°C,

quarenta e cinco segundos a 62°C e quarenta e cinco segundos a 72°C, seguidos de mais dez ciclos com trinta segundos a 95°C, quarenta e cinco segundos com a 60°C e quarenta e cinco segundos a 72°C e, por fim, quinze ciclos de trinta segundos a 95°C, quarenta e cinco segundos a 58°C e quarenta e cinco segundos a 72°C. No final, para se garantir a completa extensão de todos os fragmentos, incubou-se por 7 minutos a 72°C. O produto foi visualizado em gel de poliacrilamida 8%, com coloração em prata (SANGUINETTI et al. 1994).

As amostras que apresentaram amplificação com os primers intrônicos devido à presença de DNA genômico, foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio para análise de detecção de metilação. Foram utilizadas quatro amostras, das quais também foram analisados os tumores correspondentes.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído das linhagens celulares pela técnica do Fenol - Clorofórmio (FONG et al. 1994) adaptada.

Para a extração de DNA das amostras dos tumores emblocados em parafina foi utilizado o kit *Nucleon HT* (Amersham Life Sciences), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Esse método de extração se mostrou muito eficiente e prático, apresentando um rendimento satisfatório para esse tipo de material. Resumidamente, essa extração consiste em uma primeira fase de desparafinização (com xilol), uma segunda fase de digestão do tecido (com a enzima Proteinase K), uma terceira fase de desproteinização (com uma solução de perclorato de sódio), uma

quarta fase de extração do DNA (com clorofórmio), seguida de uma precipitação do DNA (com etanol absoluto) e subsequente lavagem (com etanol a 70%).

3.5 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

O DNA foi submetido a um tratamento de bissulfito de sódio e subsequente PCR: MSP conforme descrito por HERMAN et al. (1996), incorporando algumas modificações. Este tratamento converte as citosinas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. No momento da PCR as uracilas são convertidas em timinas. Na amplificação por PCR há dois diferentes pares de *primers*, cada par reconhece especificamente as seqüências metiladas (com as citosinas mantidas) ou as seqüências não metiladas (com timinas nos lugares das citosinas) (HERMAN et al. 1996, 1998; ESTELLER et al. 1999).

Resumidamente, o tratamento de bissulfito de sódio que estamos realizando consiste em:

- 1) Uma primeira etapa de desnaturação do DNA (1µg de DNA):
 - a) Tratar com 1µL de NaOH (0,2M);
 - b) Completar para um volume final de 50µL com água destilada autoclavada);
 - c) Incubar por dez minutos a 37°C.
- 2) Uma segunda etapa de tratamento com o bissulfito de sódio:
 - d) Adicionar 10µL de hidroquinona (10mM);
 - e) Adicionar 520µL de bissulfito de sódio (3M pH 5,0);

f) Adicionar 1 μ L DNA de esperma de Salmão ou de Arenque (20mg/mL);

g) Incubar a 50°C por 16 horas;

h) Adicionar 1mL de resina (*Wizard® DNA Clean-up Resin* -utilização do kit *Wizard® DNA Clean-up System, PROMEGA*);

i) Homogeneizar por inversão por 5 minutos;

j) Passar a resina com o DNA ligado por uma coluna;

k) Lavar a coluna com 2mL de isopropanol 80%;

l) Centrifugar a coluna conectada a um novo tubo por 2 minutos a 14.000 rpm, para secar a resina;

m) Transferir a coluna para um novo tubo e eluir adicionando 50 μ L de água pré-aquecida (65-70°C);

n) Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente;

o) Centrifugar por 1 minuto a 14.000 rpm;

p) Descartar a coluna;

q) Incubar a -20°C por 6 horas;

r) Adicionar 1,5 μ L de NaOH (10M).

3) Uma terceira etapa de precipitação do DNA:

s) Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos;

t) Adicionar 5 μ L de acetato de sódio (3M, pH 6,0) e 110 μ L de etanol 100%;

u) Adicionar 5 μ L de glicogênio (20mg/mL);

v) Manter por 16-20 horas a -20°C;

- w) Em seguida, centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 14.000rpm;
- x) Secar o precipitado;
- y) Ressuspender em 25µL de água;
- z) Armazenar a -20°C até o uso.

No caso das amostras de tumores, pela menor disponibilidade de DNA nessas amostras, nós utilizamos os passos f e u, os quais não são utilizados para o tratamento de linhagens celulares. O passo f consiste na adição de 1µL DNA de esperma de Salmão ou de Arenque (20mg/mL) que funciona como carreador de DNA nesse momento do tratamento com bissulfito de sódio e o passo u consiste na adição de 5µL de glicogênio (20mg/mL), que serve como carreador na precipitação do DNA.

3.6 REAÇÃO DE PCR

Foi realizada uma reação de PCR específica para detecção de metilação: MSP (*methylation specific PCR*) (HERMAN et al. 1996; ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001). A técnica de MSP é muito sensível; ela é capaz de detectar um alelo que apresenta metilação dentre mil que se apresentam não metilados (CAIRNS et al. 2001; ROSAS et al. 2001).

As seqüências dos *primers* para a região promotora dos genes *DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}* e *TIMP-3* foram obtidas de ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. (2001), as seqüências para o gene *RARβ* de UEKI et al. (2000), as do

gene *14-3-3σ* de FERGUSON et al. (2000), as do gene *APC* de ESTELLER et al. (2000a) e as do gene *H-CAD* de TOYOOKA et al. (2002) (Quadro 1).

As condições da reação de PCR foram padronizadas depois de muitas tentativas. Num primeiro momento, foram utilizadas as condições descritas por HERMAN et al. (1996) e, em seguida, variações desta, mantendo a utilização da enzima *Taq Polimerase (Invitrogen)*. Entretanto, o sucesso na amplificação só foi alcançado quando passamos a utilizar a enzima *AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems)*. Também optamos por utilizar o DNA diluído cinco ou dez vezes e, a partir desse procedimento, pudemos padronizar condições adequadas e ainda não descritas na literatura. A seguir, estão indicadas as novas condições da reação de PCR com as quais realizamos os testes.

Condições da reação de amplificação:

- a) 0,25mM de dNTPs;
- b) 0,5μM de *primer* direto;
- c) 0,5μM de *primer* reverso;
- d) 1,5u de AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*);
- e) 3,125mM de MgCl₂ (*Applied Biosystems*);
- f) 1X de Tampão de Reação p/ AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*);

Totalizando 18,0μL, aos quais são adicionados 2,0μL de DNA previamente tratados com bissulfito de sódio e diluídos cinco ou dez vezes.

A escolha das condições de temperaturas para amplificação foi uma etapa importante, pois foram necessárias variações nas condições de amplificação, principalmente no que diz respeito às temperaturas de anelamento específicas para

cada um dos primer utilizados. Em todos os casos, as melhores condições observadas de amplificação envolveram três etapas nas quais a temperatura de anelamento era mais alta nos primeiros dez ciclos e diminuía dois graus na etapa seguinte e outros dois graus na última (dez e quinze ciclos respectivamente). Com o uso dessas condições, os primeiros ciclos com maior temperatura asseguravam a especificidade da amplificação. Nos ciclos seguintes, a amplificação do produto específico era facilitada com a redução da temperatura, de maneira a aumentar o rendimento da amplificação. Portanto o programa da PCR apresenta dez minutos iniciais a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaq GOLD*, dez ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto com a primeira temperatura de anelamento e 1 minuto a 72°C, dez ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto com a segunda temperatura e 1 minuto a 72°C, quinze ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto com a terceira temperatura e 1 minuto a 72°C, 7 minutos a 72°C e 4°C infinito.

Para a detecção dos produtos amplificados, as amostras são aplicadas em gel de poliacrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata (SANGUINETTI et al. 1994).

Gene	Sequências dos <i>primers</i> para a situação metilada (5' - 3')	Sequências dos <i>primers</i> para a situação não metilada (5' - 3')	Referências
<i>RARβ</i>	D ^a GGATTGGGATGTCGAGAAC R ^b TACAAAAAACCTTCCGAATACG	D AGGATTGGGATGTTGAGAATG R TTACAAAAAACCTTCCAAATACA	Ueki et al. (2000)
<i>TIMP-3</i>	D CGTTTCGTTATTTTTGTTTCGGTTTC R CCGAAAACCCCGCCTCG	D TTTTGTTTGTATTTTTGTTTGGTTTT R CCCCCAAAACCCCAATCA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>P16</i>	D TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC R GACCCGAACCGCGACCGCGACCGTAA	D TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT R CAACCCCAAACCACAACCATAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>MGMT</i>	D TTTGACGTTTCGTAGGTTTTCGC R GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	D TTTGTGTTTGTAGTTTGTAGGTTTTGT R AACTCCACACTCTCCAAAAACAAAACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>DAPK</i>	D GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC R CCCTCCCAAACGCGA	D GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT R CAAATCCCTCCCAAACACCAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>E-CAD</i>	D TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT R TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	D TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT R CACAACCAATCAACAACACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>P14</i>	D GTGTAAAGGGCGGCGTAGC R AAAACCCTCACTCGCGACGA	D TTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT R CAAAAAACCTCACTCACAACAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>GSTP1</i>	D TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC R GCCCAATACTAAATCACGACG	D GATGTTGGGGTGTAGTGGTTGTT R CCACCCAATACTAAATCACAACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>14-3-3σ</i>	D TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC R CCTCTAACC GCCCACCACG	D ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT R CCCTCTAACCACCCACCACA	Ferguson et al. (2000)
<i>APC</i>	D TATTGTGGAGTGGGGGTC R TGCACGAACTCCCGACGA	D GTGTTTATTGTGGAGTGTGGGTT R CCAATCAACAACTCCCAACAA	Esteller et al. (2000)
<i>H-CAD</i>	D TCGCGGGGTTGTTTTTCGC R GATGTTTTTCATTCATACACGCG	D TTGTGGGGTTGTTTTTGT R AACTTTTCATTCATACACACA	Toyooka et al. (2001)

^a Primer direto, ^b Primer reverso

Quadro 1 - Sequência dos *primers* utilizados na MSP

3.7 PESQUISA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS NA URINA USANDO MSP

A linhagem celular T24 derivada de câncer de bexiga foi colocada em cultura e quando atingiu aproximadamente 75% da confluência da garrafa com superfície de 75 cm², as células foram soltas por utilização de tripsina e contadas.

A urina de um voluntário saudável foi colhida. Foram preparadas misturas artificiais com essa urina normal e as células obtidas da cultura. A partir da mistura inicial com quantidade conhecida de células, foram feitas diluições seriadas e o número de células de cada uma das amostras foi calculado. De cada amostra, foram utilizados para análise 100µL. Como controles do experimento, também foram processados 100µL de urina normal do mesmo doador, 200µL solução fisiológica (Cloreto de sódio – NaCl 0,9%) pura e também misturada com uma quantidade de células determinada previamente. O DNA dessas amostras foi extraído pelo kit *perfect gDNA Blood Mini Isolation Kit (Eppendorf)*, seguindo as instruções do fabricante no protocolo para extração de DNA de sangue humano e animal. Foi acrescentado a esse protocolo um passo adicional, antes do início da extração foram adicionado às amostras 100 µL de PBS 1X com o intuito de neutralizar o pH da urina.

Para verificar a presença de DNA nessas amostras, foi realizada uma reação de PCR utilizando *primers* (direto: 5'-TTGTGTCTCTAGTTCTGG-3' e reverso: 5'-CATTGTTGTAGTAGCTCTGC-3') desenhados nos íntrons 12 e 13 do gene *hMLH1* (*humam mut-L homologue 1*), a mesma citada acima no item das urinas dos pacientes. Com o uso desses primers intrônicos, a presença de amplificação significa que DNA genômico está presente na amostra.

As amostras de DNA foram submetidas ao tratamento de bissulfito de sódio e subsequente MSP, utilizando os *primers* para a região promotora do gene *RARβ*, pois o padrão de metilação da região promotora desse gene na linhagem T24 já havia sido estabelecido (apresentava alelos metilados).

3.8 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO

Para a amplificação da região promotora do gene *ADAM23*, foram realizadas duas reações, sendo a segunda tendo sido feita com o produto da primeira (o que é chamado de *nested PCR*). As condições de amplificação foram iguais para as duas reações e foram as seguintes: 1,5mM de MgCl₂, 0,2μM de dNTPs, 0,16μM de cada *primer*, 1X tampão de reação da *AmpliTaQ GOLD*, 1,0u *AmpliTaQ GOLD* (*Applied Biosystems*). As seqüências dos *primers* utilizados na primeira reação foram: direto 5' - TTTGTTTTGGATAAATTAAGGTTA - 3' e reverso 5' - CTACAAAATCAAACTAAATCTC - 3'. As seqüências dos *primers* utilizados na segunda reação foram: direto 5' - GTATGTAAATATAAAGGATTGTAG - 3' e reverso 5' - ATAAAAATATATCCTCCTAAATAT - 3'. As condições de amplificação da primeira reação apresentam dez minutos iniciais a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaQ GOLD*, um ciclo com três minutos a 95°C, três minutos a 50°C e dois minutos a 72°C, cinco ciclos com três minutos a 95°C, três minutos a 53°C e dois minutos a 72°C, trinta e cinco ciclos com um minuto a 95°C, um minuto a 55°C e um minuto a 72°C, 7 minutos a 72°C e 4°C infinito. As condições de amplificação da segunda reação apresentam dez minutos iniciais a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaQ GOLD*, um ciclo com 3 minutos a 95°C, 3 minutos a 45°C e 2 minutos a

72°C, cinco ciclos repetidos com 3 minutos a 95°C, 3 minutos a 48°C e 2 minutos a 72°C, 35 ciclos com 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C, 7 minutos a 72°C e 4°C infinito. Sempre os produtos obtidos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8%, com coloração em prata (SANGUINETTI et al. 1994). O tamanho do produto amplificado é de 390bp.

A clonagem dos fragmentos amplificados foi realizada com o kit comercial TA Cloning® Kit (*Life Technologies- Invitrogen*) segundo instruções do fabricante.

O seqüenciamento foi realizado com o kit *Big Dye* versão 3 (*Applied Biosystems*) segundo instruções do fabricante e o seqüenciador usado foi o ABI 3100 (*Applied Biosystems*).

3.9 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi isolado de pequenas quantidades de tecido (1 a 10 mg) utilizando-se TRIZOL® (*Life Technologies- Invitrogen*) conforme especificações fornecidas pelo fabricante.

Para avaliar a qualidade do RNA, verificou-se a contaminação com DNA por PCR utilizando *primers* (direto 5'-TTGTGTCTCTAGTTCTGG-3' e reverso 5'-CAT TGTGTAGTAGCTCTGC-3') desenhados nos íntrons 12 e 13 do gene *hMLH1* (*humam mut-L homologue 1*). As seguintes condições de amplificação foram utilizadas: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,3µM de cada *primer*, 1X tampão de reação da *AmpliTaq GOLD* e 1,5u de *AmpliTaq GOLD* (*Applied Biosystems*). O programa da PCR apresenta dez minutos iniciais a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaq GOLD*, dez ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos com a

temperatura de 62° e 45 segundos a 72°C, dez ciclos com 30 segundos a 95° C, 45 segundos com a temperatura de 60° e 45 segundos a 72°C, quinze ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos com a temperatura de 58°C e 45 segundos a 72°C, 7 minutos a 72°C e 4°C infinito.

Quando fosse detectada a presença de DNA, era feito um tratamento com DNase (*RQ1 Rnase-Free Dnase- Promega*) segundo as instruções do fabricante seguida de nova extração por TRIZOL® (*Life-Tecnologies-Invitrogen*), descrita anteriormente. Para a confirmação do tratamento, o teste de *hMLH1* era repetido.

Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 µg de RNA total, 0.5 µg de *primer* (oligo(dT)₁₈) 1µL de dNTPs (10mM) e água ("RNase-free") até 11µL. A mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos e armazenada em gelo. Em seguida, foram adicionados 4µL de Tampão para síntese da primeira fita 5X, 2µL de DTT 0,1M, 200u de *RNase out* e 40u da enzima *SuperScriptII* (*Life Technologies- Invitrogen*). A reação seguiu com incubação a 42°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos.

3.10 RT-PCR

Os *primers* utilizados para verificação da expressão do gene *ADAM23* foram: direto : 5'- TATGAGCAGCTGTCCACTCG -3' e reverso : 5'-CCCCAGCCTGTG CCCCCAAG -3'. O tamanho do produto amplificado é de 247bp. As condições de amplificação utilizadas foram: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2µM de dNTPs, 0,4µM de cada *primer* , 1X tampão de reação da *Taq* , 1,0u de *Taq* (*Life Technologies- Invitrogen*). As condições de amplificação apresentam 4 minutos iniciais de desnaturação, 35

ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C e 1 minuto a 72°C, seguidos por 6 minutos a 72°C e 4°C infinito.

Para confirmar a síntese de cDNA, as amostras foram amplificadas com *primers* desenhados em introns do gene constitutivo *GAPDH* (direto: 5' - CTGCAC CACCAACTGCTTA - 3' e reverso: 5' - CATGACGGCAGGTCAGGTC - 3'). O tamanho do produto amplificado é de 305bp. As condições de amplificação foram: 1,0 mM de MgCl₂, 0,2μM de dNTPs, 0,3μM de cada *primer*, 1X tampão de reação da *Taq*, 0,5u *Taq* (*Life Technologies- Invitrogen*). As condições de amplificação apresentam 4 minutos iniciais de desnaturação, 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 62°C e 1 minuto a 72°C, seguidos por 6 minutos a 72°C e 4°C infinito.

3.11 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA MSP

Os *primers* para a MSP na região promotora do gene *ADAM23* foram desenhados com a ajuda do programa MethPrimer versão v1.1 disponível na internet (<http://www.dahyaurology.com>).

As seqüências dos *primers* desenhados para a MSP são para a situação metilada: direto 5'-TTTTTATGAATTTTGTAGTAAATATCGTTTCG-3' e reverso 5'-GAAATAACAAAAATCCCCCG-3' e para a situação não metilada: direto 5'-GAATTTTGTAGTAAATATTGTTTGG-3' e reverso 5'-CAAAATAACAAAAA TCCCCCAC-3' e o tamanho do fragmento amplificado é de 118bp.

A padronização da reação de MSP seguiu as condições de amplificação utilizadas para os outros genes estudados por este trabalho (citadas acima, no item 6) e se mostrou satisfatória.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise estatística foi realizada com o programa estatístico SPSS versão 10.0 e foi supervisionada pela Prof^ª Dra. Maria do Rosário D. O. Latorre do Departamento de Epidemiologia da Escola de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e pelo Dr. André Carvalho, do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer.

As associações entre parâmetros foram avaliadas pelo teste de associação pelo Qui-quadrado ou Fisher. As diferenças foram consideradas significativas quando o p foi menor que 0,05.

As freqüências de recidiva foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank foi utilizado para a análise. As análises foram consideradas significativas quando o p foi menos que 0,05.

Para a determinação a taxa global de metilação em cada paciente individualmente, foi calculado um índice de metilação (MI) (MARUYAMA et al. 2001; ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001).

Esse índice foi calculado para cada caso através da fórmula:

$MI = \frac{\text{Total de genes metilados}}{\text{Total de genes analisados}}$

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

O primeiro passo para a avaliação do padrão de hipermetilação de um painel de genes foi a padronização das condições de amplificação para cada um dos onze genes escolhidos (*DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *RAR β* , *TIMP-3*, *14-3-3 σ* , *APC* e *H-CAD*). Para tanto, foram utilizadas, inicialmente, sete linhagens celulares derivadas de diversos tipos de câncer, todas disponíveis no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo: HCT 116 (derivada de carcinoma colorretal), DLD-1, SW480, HT 29 (derivadas de adenocarcinoma colorretal), Du 145 (derivadas de células indiferenciadas de metástase cerebral de carcinoma de próstata), H 1299 (derivadas de carcinoma de células não pequenas de pulmão) e MCF-7 (derivadas de adenocarcinoma de mama). Posteriormente, foram utilizadas cinco linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga: SW 780, T 24, HT-1376 e J82 (derivadas de carcinoma de células transicionais) e SCABER (derivadas de carcinoma de células escamosas). Todas as linhagens celulares são provenientes da ATCC - American Type Culture Collection.

A padronização da reação de PCR foi necessária, uma vez que as temperaturas de anelamento calculadas para cada um dos *primers* (direto e reverso) utilizados nas reações eram diferentes. Essas temperaturas de anelamento também foram otimizadas para que fosse possível a utilização de uma mesma condição de reação tanto para o estado metilado quanto para o não-metilado, possibilitando, desta

forma, que as reações ocorressem simultaneamente. Tal ajuste foi imprescindível para o desenrolar do trabalho, pois, estas temperaturas de anelamento tiveram de ser ajustadas para permitir que os *primers* pudessem discriminar o estado metilado do não-metilado, o que, em muitos casos, significava uma diferença em apenas um nucleotídeo da região 3' da sequência de cada *primer*. Considerando todas as reações realizadas, as temperaturas de anelamento variaram entre 54°C e 64°C (Quadro 2). O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 81 a 243pb (pares de base).

Este processo de padronização iniciou-se tomando por base as condições descritas por HERMAN et al. (1996) e, em seguida, foram introduzidas algumas variações. Num primeiro momento, estávamos utilizando a enzima Taq Polimerase (*Invitrogen*), mas não foi possível obter um produto amplificado específico. As reações de PCR só funcionaram adequadamente quando passou-se a utilizar a enzima *AmpliTaq GOLD* (*Applied Biosystems*). Essa enzima, por só permitir o início da reação quando a temperatura está elevada (*hot start*), aumenta a especificidade da reação. Também optamos por utilizar amostras de DNA diluídas (cinco ou dez vezes), pois a presença de resquícios de bissulfito de sódio podem inibir a reação de PCR. Após este processo de padronização, a condição de reação de PCR que passamos a utilizar foi: 0,25mM de dNTPs; 0,5µM de cada *primer* (direto e reverso); 3,125mM de MgCl₂; 1X Tampão de Reação da *AmpliTaq GOLD*; 1,5u de *AmpliTaq GOLD*. A cada reação era acrescentado 2,0µL de DNA previamente tratados com bissulfito de sódio e diluídos cinco ou dez vezes. O volume final de reação sempre foi de 20µL.

Gene	Temperaturas da PCR*	Tamanho do amplicon (bp)
<i>RARβ</i>	58 - 56 - 54	M - 100 U - 100
<i>TIMP-3</i>	56 - 54 - 52	M - 116 U - 122
<i>P16</i>	66 - 64 - 62	M - 150 U - 151
<i>MGMT</i>	64 - 62 - 60	M - 81 U - 93
<i>DAPK</i>	62 - 60 - 58	M - 98 U - 106
<i>E-CAD</i>	58 - 56 - 54	M - 115 U - 97
<i>P14</i>	64 - 62 - 60	M - 122 U - 132
<i>GSTP1</i>	54 - 52 - 50	M - 91 U - 97
<i>14-3-3σ</i>	66 - 64 - 62	M - 105 U - 107
<i>APC</i>	62 - 60 - 58	M - 98 U - 108
<i>H-CAD</i>	60 - 58 - 56	M - 243 U - 243

M = produto obtido da amplificação com os *primers* desenhados para as seqüências metidadas.

U = produto obtido da amplificação com os *primers* desenhados para as seqüências não metidadas.

* Temperaturas de anelamento usadas nos dez primeiros ciclos e nos dez e quinze ciclos seguintes, respectivamente.

Quadro 2 - Condições padronizadas para a MSP

4.2 PADRÃO DE METILAÇÃO EM LINHAGENS CELULARES

O perfil de metilação (detecção da presença de alelos metilados ou não-metilados) da região promotora dos onze genes incluídos neste estudo foi analisado em cinco diferentes linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga (SW 780, T 24, HT-1376, J82 e SCABER) (Figura 2) e em quatro linhagens derivadas de câncer de colon (HCT 116, DLD-1, SW480 e HT 29), uma linhagem derivada de câncer de mama (MCF-7), uma de câncer de próstata (Du 145) e uma de câncer de pulmão (H 1299) (Figura 3).



O padrão de metilação de alguns dos genes selecionados para este estudo já havia sido, previamente, avaliado em algumas das linhagens celulares também selecionadas. A linhagem MCF-7 apresenta a região promotora do gene *E-caderina* não-metilado (NASS et al. 2000); a linhagem T24 apresenta alelos metilados para o gene *P16* (FLORD et al. 2000); o gene *TIMP-3* apresenta-se não-metilado na linhagem SW 480 e metilado na linhagem HT29 (BACHMAN et al. 1999).

Conforme pode-se notar na Figura 2 o gene *RAR β* se apresentou metilado em quatro linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga, enquanto os genes *E-CAD*, *14-3-3 σ* e *APC* se apresentaram metilados em duas linhagens celulares. Os genes *P16*, *MGMT*, *HCAD* e *DAPK* se apresentaram metilados em apenas uma linhagem celular e não foi detectada, em nenhuma das linhagens derivadas de câncer de bexiga analisadas, metilação nos genes *TIMP3*, *P14* e *GSTP1* (Figura 2). A análise realizada com as linhagens celulares derivadas de outros tipos de câncer revelou que o gene *RAR β* encontra-se metilado em cinco linhagens, os genes *E-CAD* e *MGMT* se apresentaram metilados em duas e os genes *P16*, *DAPK*, *TIMP3*, *P14* e *GSTP1* se apresentaram metilados em apenas uma linhagem celular (Figura 3). O padrão de metilação dos genes *14-3-3 σ* , *APC* e *H-CAD* não foi avaliado para estas linhagens. Nem todos os genes foram testados nessas linhagens, pois houve a possibilidade de utilização de linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga e a maioria dos controles já havia sido estabelecida sem a necessidade de dar continuidade a essas análises, que fizeram parte da etapa de padronização.

Linagem	14-3-3σ	RARβ	APC	E-CAD	DAPK	GSTP	HCAD	P14	P16	MGMT	TIMP
SCABER											
HT 1376											
T24											
SW 780											
J82											

Figura 2 - Perfil de metilação da região promotora dos genes *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC*, *E-CAD*, *DAPK*, *GSTP1*, *HCAD*, *P14*, *P16*, *MGMT* e *TIMP3* em de linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga. Caixas pretas, amostras que são metiladas. Caixas brancas, amostras que são não-metiladas.

Linagem	RARβ	E-CAD	DAPK	GSTP	P14	P16	MGMT	TIMP
HCT 116								
DLD-1								
SW 480								
Du 145								
H 1299								
HT 29								
MCF-7								

Figura 3 - Perfil de metilação da região promotora dos genes *RARβ*, *E-CAD*, *DAPK*, *GSTP1*, *P14*, *P16*, *MGMT* e *TIMP3* em linhagens celulares derivadas de deferentes tipos de câncer. HCT 116, HT 29, DLD-1 e SW 480: carcinoma colorectal; Du 145, carcinoma de próstata; H 1299, carcinoma de pulmão; MCF-7, adenocarcinoma de mama. Caixas pretas, amostras que são metiladas. Caixas brancas, amostras que são não-metiladas.

Em algumas linhagens celulares, o experimento de MSP foi capaz de amplificar fragmentos tanto com os *primers* para o estado metilado quanto para o não-metilado de um mesmo gene. Este resultado pode ser justificado pela heterogeneidade das linhagens celulares. Em todos os experimentos foram sempre utilizadas linhagens celulares tumorais, derivadas de tumores e não de uma célula isolada, ou seja, trata-se de uma população heterogênea de células e não de clones de uma única célula. Portanto, é esperado encontrar células com diferenças em seus DNAs, reproduzindo *in vitro* a situação de células de um tumor, as quais podem apresentar características diferentes umas das outras.

Linhagens celulares são amplamente utilizadas em diferentes tipos de pesquisas sobre o câncer, incluindo estudos sobre hipermetilação de promotores

gênicos. No entanto, já se sabe que os resultados obtidos com experimentos que utilizam linhagens celulares de tumores não refletem necessariamente a realidade biológica dos tumores dos pacientes. SMIRAGLIA et al. (2001) mostraram que linhagens celulares derivadas de diversos tipos de câncer exibem níveis significativamente maiores de hipermetilação nas ilhas de CpG que amostras de tumores das quais elas foram derivadas. Portanto, uma vez que as reações de PCR (MSP) estavam padronizadas, deu-se início à próxima fase do trabalho que foi avaliar o padrão de expressão do painel de genes previamente selecionados em amostras de tumores de bexiga.

4.3 AMOSTRAS DE TUMORES

Inicialmente, as amostras de tumores de bexiga a serem estudadas deveriam ser provenientes do Banco de Tumores do Hospital A. C. Camargo - SP, entretanto, optou-se pela utilização de amostras de tecidos emblocados em parafina, provenientes do arquivo do Hospital A. C. Camargo - SP. Essa mudança foi possível pelo sucesso que obtivemos na padronização dos testes com DNAs provindos de tecidos fixados e emblocados em parafina. Esta mudança permitiu a seleção de pacientes com um maior tempo de seguimento e, portanto, com a vantagem de ser possível correlacionar os achados moleculares com dados clínico-patológicos. A Tabela 1 resume as características clínico patológicas dos pacientes incluídos neste estudo.

A caracterização da população demonstra a proporção esperada entre homens e mulheres, que é de aproximadamente três a quatro homens para cada mulher com

câncer de bexiga (DOMINGUEZ et al. 2002). Na população em foco, são observados trinta homens e oito mulheres, ou seja, uma proporção de 3,75:1. Observa-se, ainda, que o câncer de bexiga é mais incidente em pessoas idosas, sendo que na população estudada 71,1% dos pacientes foram diagnosticados com idade acima de sessenta anos. A variável tabagismo não pode ser avaliada, pois essa informações não constava nos prontuários de três pacientes (Tabela 1).

No conjunto estudado, a principal terapia utilizada foi a cirurgia, estando aí incluídas: biópsia, ressecção transuretral, cistostectomia e cistoprostatectomia. As frequências apresentadas com relação às terapias utilizadas não são exclusivas, há pacientes que foram submetidos a mais de um tipo de terapia. A maioria da população manteve-se viva (84,2%). Aproximadamente metade (45,9%) dos pacientes apresentou recidiva local (um paciente foi excluído da análise com esta variável, pois foi admitido no Hospital do Câncer já com um tumor que era uma recidiva). 18,4% dos pacientes apresentaram metástases. Em termos de estadiamento, baseando-se na classificação TNM, 76,3% dos pacientes apresentaram tumores em estadio 1 e destes 62,1% eram Ta (superficial). A maioria dos tumores era de baixo grau (71,1%). A maioria dos pacientes era fumante (71,5%). E os diagnósticos mais frequentes foram: carcinoma urotelial papilar de baixo grau (34,2%) e carcinoma urotelial invasor (26,3%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros clínico-patológicos das amostras tumorais

Variável	Frequências n° (%)
Sexo	
Masculino	30 (78,9)
Feminino	8 (21,1)
Idade (anos)	
Maior ou igual a 60	27 (71,1)
Menor que 60	11 (28,9)
Estadio	
1	29 (76,3)
2, 3 e 4	9 (23,7)
Estadio 1	
Ta	18 (62,1)
T1	11 (37,9)
Grau do tumor	
Alto	11 (28,9)
Baixo	27 (71,1)
Diagnóstico	
NUPBPM ^a	9 (23,7)
CUPBG ^b	13 (34,2)
CUPAG ^c	6 (15,8)
CUI ^d	10 (26,3)
Recidiva local**	
Sim	17 (45,9)
Não	20 (54,1)
Metástase	
Sim	7 (18,4)
Não	31 (81,6)
Óbito	6 (15,8)
Terapia	
Radioterapia	5 (13,2)
Quimioterapia	3 (7,9)
Cirurgia	30 (78,9)
BCG	8 (21,1)
Tabagismo*	
Não	10 (28,5)
Sim	25 (71,5)
Total	38 (100)

^a NUPBPM Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno

^b CUPBG Carcinoma urotelial papilar de baixo grau

^c CUPAG Carcinoma urotelial papilar de alto grau

^d CUI Carcinoma urotelial invasor

* Os pacientes com informação ignorada foram excluídos

** 1 paciente foi excluído, pois foi admitido já em recidiva.

Para confirmar a estreita relação existente entre os dados obtidos com as amostras emblocadas em parafina e o material fresco e descartar a possibilidade de haver distorções nos dados obtidos causadas pelo processo de fixação do material parafinado, foram selecionadas duas amostras de câncer de bexiga depositadas no Banco de Tumores e os seus blocos de parafina correspondentes no arquivo e o perfil de metilação da região promotora dos 11 genes previamente selecionados foi analisado. O perfil de metilação encontrado nas amostras emblocadas em parafina foi idêntico ao encontrado no material fresco. Frente a esses resultados, a opção pelas amostras do arquivo se mostrou adequada e vantajosa, por oferecer a possibilidade da utilização de pacientes com maior tempo de seguimento, o que permitiria correlacionar os achados moleculares com os parâmetros clínico-patológicos.

Durante o trabalho, após análise dos tumores emblocados em parafina e seleção das regiões com maior proporção de células tumorais de amostras provenientes de trinta e oito pacientes, os DNAs foram extraídos e tratados com bissulfito de sódio. Após este tratamento, as amostras foram submetidos à análise por MSP.

Quando não se obteve amplificação com nenhum dos *primers*, tanto para as seqüências metiladas quanto para não metiladas, o processo foi reiniciado desde seu princípio, procedendo-se novamente a extração do DNA a partir do tecido emblocado e o subsequente tratamento com bisulfito e reação de amplificação (MSP).

4.4 PERFIL DE METILAÇÃO DOS TUMORES ESTUDADOS

O padrão de metilação da região promotora dos 11 genes selecionados foi determinado através da técnica de MSP. Os quatro genes que apresentaram a sua região promotora mais frequentemente metilada nos tumores foram: *14-3-3 σ* (68,4%), *RAR β* (60,5%), *APC* (57,9%) e *E-CAD* (42,1%). Nos outros sete genes restantes, as frequências de metilação encontradas foram menores que 15% (Tabela 2). Considerando os trinta e oito casos estudados, podemos observar o perfil de metilação dos onze genes, individualmente, na figura 4. Fica evidente, portanto, a predominância da metilação na região promotora dos quatro genes citados acima. Para ilustrar os resultados, a figura 5 mostra o padrão de metilação detectado nas regiões promotoras dos genes *APC*, *RAR β* e *14-3-3 σ* em amostras tumorais e linhagens celulares.

Tabela 2 - Frequência de metilação na região promotora dos 11 genes estudados em amostras tumorais.

Gene	Frequência n° (%)
<i>14-3-3σ</i>	
Não metilado	12 (31,6)
metilado	26 (68,4)
<i>RARβ</i>	
Não metilado	15 (39,5)
metilado	23 (60,5)
<i>APC</i>	
Não metilado	16 (42,1)
metilado	22 (57,9)
<i>ECAD</i>	
Não metilado	22 (57,9)
metilado	16 (42,1)
<i>DAPK</i>	
Não metilado	33 (86,8)
metilado	5 (13,2)
<i>GSTP1</i>	
Não metilado	34 (89,5)
metilado	4 (10,5)
<i>HCAD</i>	
Não metilado	34 (89,5)
metilado	4 (10,5)
<i>P14</i>	
Não metilado	34 (89,5)
metilado	4 (10,5)
<i>P16</i>	
Não metilado	34 (89,5)
metilado	4 (10,5)
<i>MGMT</i>	
Não metilado	36 (94,7)
metilado	2 (5,3)
<i>TIMP-3</i>	
Não metilado	38 (100)
metilado	0 (0)
Total	38 (100)

CASO	14-3-3σ	RARβ	APC	E-CAD	DAPK	GSTP	H-CAD	P14	P16	MGMT	TIMP
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											
31											
32											
33											
34											
35											
36											
37											
38											

Figura 4 - Perfil de metilação da região promotora dos genes *RARβ*, *E-CAD*, *DAPK*, *GSTP1*, *P14*, *P16*, *MGMT* e *TIMP3* em amostras tumorais de cada um dos trinta e oito pacientes incluídos neste estudo. Caixas pretas, amostras que são metiladas. Caixas brancas, amostras que são não-metiladas.

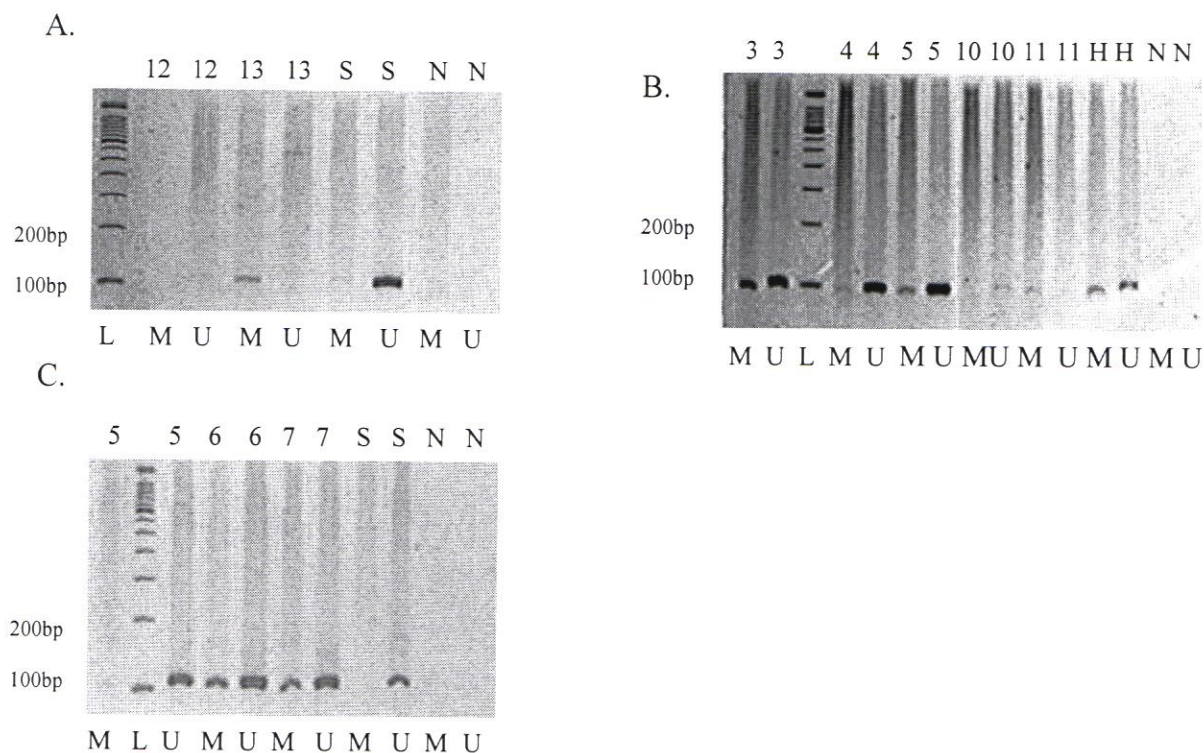


Figura 5 - Perfil de metilação na região promotora dos genes *APC*, *RARβ* e *14-3-3σ*. Após a reação de MSP, os produtos obtidos foram resolvidos em géis de poliacrilamida a 8% e visualizados através da coloração com prata. A. Status de metilação do gene *APC* nos casos 12, 13 e na linhagem celular SCABER (S). B. Status de metilação do gene *RARβ* nos casos 3, 4, 5, 10, 11 e na linhagem celular HT 1376 (H). C. Status de metilação do gene *14-3-3σ* nos casos 5, 6, 7 e na linhagem celular SCABER (S). (N) controle negativo sem DNA, (L) marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen), (M) situação metilada e (U) situação não metilada.

Foram analisadas oito amostras de tecido normal de bexiga, sete correspondentes às amostras tumorais (amostras 1, 5, 13, 15, 22, 37 e 38) e uma proveniente de uma bexiga sem sinal de doença. Todas essas amostras foram analisadas para verificar o status de metilação das regiões promotoras do painel de onze genes incluídos neste estudo e em todas as amostras os promotores dos 11 genes se apresentaram não-metilados.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E O PERFIL DE METILAÇÃO DOS TUMORES ESTUDADOS

Frente aos resultados de frequência de metilação apresentados pelos 11 genes nas amostras tumorais dos 38 pacientes, foi realizada a associação da presença da metilação na região promotora dos quatro genes mais frequentemente metilados (*14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD*) com os parâmetros clínico-patológicos destes pacientes (Tabelas 5 e 6). Para a variável tabagismo, foram excluídos da associação os pacientes com informação ignorada e para a variável recidiva local, um paciente foi excluído por ter sido admitido no Hospital do Câncer com uma recidiva. Também foi feita associação com diagnóstico, estadio, idade, presença de metástase e grau do tumor. Neste trabalho, foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentaram um valor de p menor que 0,05.

A associação entre presença de metástase e metilação na região promotora do gene *E-CAD* se mostrou estatisticamente significativa. Também se mostrou estatisticamente significativa, a associação entre metilação no gene *14-3-3 σ* e a subdivisão do estadio 1 (em T1 e Ta, que é mais superficial e não apresenta invasão). Todos os tumores de estadio T1, ou seja, não Ta, apresentaram a região promotora desse gene metilada. A associação entre estadio (1 contra 2,3 e 4) e metilação na região promotora do gene *APC*, mostrou uma tendência de correlação com os estadios mais avançados (2, 3 e 4).

Tabela 3 - Associação da metilação dos genes *RARβ* e *14-3-3σ* com parâmetros clínico-patológicos

Variável	Categoria	<i>RARβ</i>		P	<i>14-3-3σ</i>		P
		Não Metilado	Metilado		Não Metilado	Metilado	
ESTADIO	1	12 (41,4)	17 (58,6)	1,000	8 (27,6)	21 (72,4)	0,423
	2, 3 e 4	3 (33,3)	6 (66,7)		4 (44,4)	5 (55,6)	
ESTADIO I	Ta	8 (44,4)	10 (55,6)	0,717	8 (44,4)	10 (55,6)	0,012
	T1	4 (36,4)	7 (63,6)		0 (0)	11 (100)	
DIAGNÓSTICO	NUPBPM	4 (44,4)	5 (55,6)	0,277	3 (33,3)	6 (66,7)	0,910
	CUPBG	6 (46,2)	7 (53,8)		4 (30,7)	9 (69,3)	
	CUPAG	3 (50)	3 (50)		2 (33,3)	4 (66,7)	
	CUI	2 (20)	8 (80)		3 (30)	7 (70)	
IDADE (anos)	Menor de 60	7 (63,6)	4 (36,4)	0,073	6 (54,5)	5 (45,5)	0,068
	Maior de 60	8 (29,6)	19 (70,4)		6 (22,3)	21 (77,7)	
TABAGISMO*	Não	4 (40)	6 (60)	1,000	3 (30)	7 (70)	1,000
	Sim	9 (36)	16 (64)		7 (28)	18 (72)	
GRAU	Alto	6 (54,5)	5 (45,5)	0,285	3 (27,3)	8 (30,8)	1,000
	Baixo	9 (33,3)	18 (66,7)		9 (33,3)	18 (66,7)	
RECIDIVA LOCAL	Sim	6 (35,3)	11 (64,7)	0,738	5 (29,4)	12 (70,6)	1,000
	Não	9 (45)	11 (55)		6 (30)	14 (70)	
METÁSTASE	Sim	4 (57,1)	3 (42,9)	0,401	2 (28,6)	5 (71,4)	1,000
	Não	11 (35,5)	20 (64,5)		10 (32,3)	21 (67,7)	
TOTAL				38 (100)			38 (100)

* Os pacientes com informação ignorada foram excluídos

^a Números entre parênteses são porcentagens^b NUPBPM Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno^c CUPBG Carcinoma urotelial papilar de baixo grau^d CUPAG Carcinoma urotelial papilar de alto grau^e CUI Carcinoma urotelial invasor

Tabela 4 - Associação da metilação dos genes *APC* e *E-CAD* com parâmetros clínico-patológicos.

Variável	Categoria	<i>APC</i>		P	<i>E-CAD</i>		P
		Não Metilado	Metilado		Não Metilado	Metilado	
ESTADIO	1	15 (51,7)	14 (48,3)	0,052	18 (62,1)	11 (37,9)	0,290
	2, 3 e 4	1 (11,2)	8 (88,8)		4 (44,4)	5 (55,6)	
ESTADIO I	Ta	10 (55,6)	8 (44,4)	0,710	11 (61,1)	7 (38,9)	1,000
	T1	5 (45,5)	6 (54,5)		7 (63,6)	4 (36,4)	
DIAGNÓSTICO	NUPBM	3 (33,3)	6 (66,7)	0,359	6 (66,7)	3 (33,3)	0,963
	CUPBG	8 (61,5)	5 (38,5)		7 (53,8)	6 (46,2)	
	CUPAG	3 (50)	3 (50)		2 (33,3)	4 (66,7)	
	CUI	2 (20)	8 (80)		7 (70)	3 (30)	
IDADE (anos)	Menor de 60	7 (63,6)	4 (36,4)	0,073	6 (54,5)	5 (45,5)	1,000
	Maior de 60	8 (53,3)	19 (70,4)		16 (59,3)	11 (40,7)	
TABAGISMO*	Não	4 (40)	6 (60)	1,000	4 (40)	6 (60)	0,151
	Sim	11 (44)	14 (56)		17 (68)	8 (32)	
GRAU	Alto	3 (27,3)	8 (72)	0,293	6 (54,5)	5 (45,5)	1,000
	Baixo	13 (48,1)	14 (51,9)		16 (59,3)	11 (40,7)	
RECIDIVA LOCAL	Sim	8 (47,1)	9 (52,9)	0,746	11 (64,7)	6 (40)	0,738
	Não	8 (40)	12 (60)		11 (55)	9 (60)	
METÁSTASE	Sim	3 (42,9)	4 (57,1)	1,000	1 (14,3)	6 (85,7)	0,028
	Não	13 (41,9)	18 (58,1)		21 (67,7)	10 (32,3)	
TOTAL		38 (100)			38 (100)		

* Os pacientes com informação ignorada foram excluídos

^a Números entre parênteses são porcentagens

^b NUPBPM Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno

^c CUPBG Carcinoma urotelial papilar de baixo grau

^d CUPAG Carcinoma urotelial papilar de alto grau

^e CUI Carcinoma urotelial invasor.

Foi aplicado o método de Kaplan-Meier relacionando o perfil de metilação da região promotora de cada um dos quatro genes com sobrevida global, ou seja, comparando pacientes que morreram e pacientes que estão vivos, mesmo que ainda tenham doença e não foi possível determinar uma correlação estatisticamente significativa. Isso já era esperado devido ao pequeno número de óbitos nesta casuística.

Outra análise feita buscou correlacionar o perfil de metilação da região promotora de cada um dos quatro genes com sobrevida livre de recidivas, ou seja,

comparando os pacientes que recidivaram com os que não recidivaram, independente de qualquer outro fator e não foi possível determinar uma correlação estatisticamente significativa.

Uma terceira análise buscou correlacionar o perfil de metilação da região promotora de cada um dos quatro genes com sobrevida livre de metástases, ou seja, comparando pacientes que apresentaram metástase com os que não apresentaram, independente de qualquer outro fator e nesta análise foi possível estabelecer uma correlação com tendência estatisticamente significativa: entre a presença de metilação na região promotora do gene *E-CAD* e a presença de metástase (Figura 6).

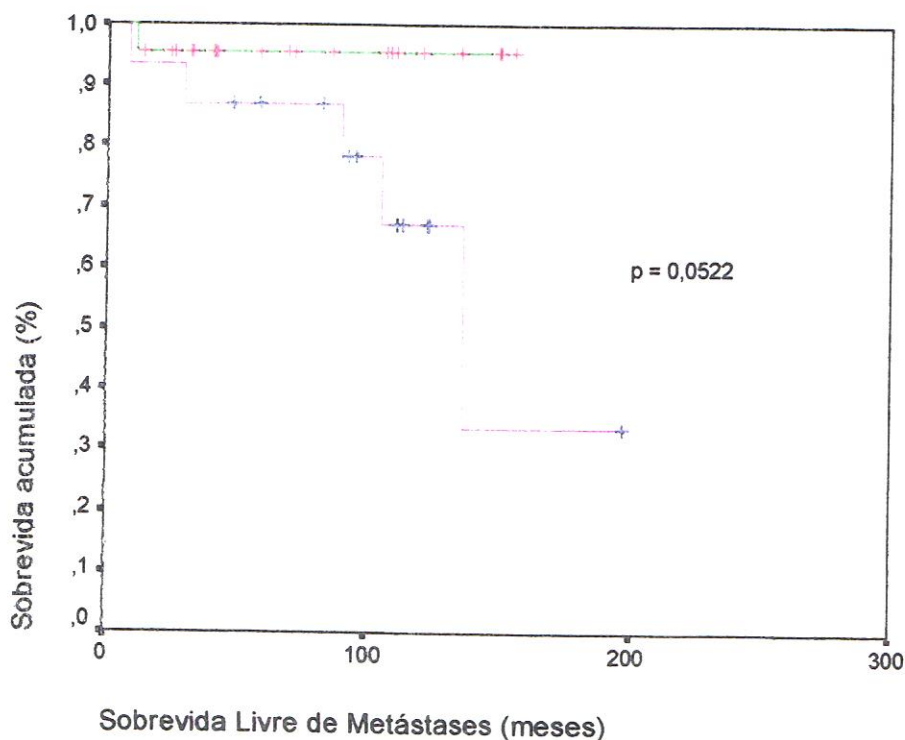


Figura 6 - Relação entre o *status* de metilação do gene *E-CAD* e sobrevida livre de metástases dos pacientes portadores de câncer de bexiga. Em rosa, metilado. Em verde, não-metilado.

4.6 ÍNDICE DE METILAÇÃO

MARUYAMA et al. (2001) e ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. (2001) propuseram um índice de metilação (MI) para comparar a extensão de metilação no painel de genes analisados, podendo assim determinar a taxa global de metilação em cada amostra individualmente.

No presente estudo, o índice de metilação foi calculado considerando os quatro genes mais frequentemente metilados: *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC* e *E-CAD*. Na figura 7, o MI de cada caso está indicado juntamente com o *status* de metilação. Em três casos (7,9% do total de 38 casos) o MI foi igual a 1, o que significa que apresentaram os quatro genes metilados, em dezesseis casos (42,1%) o MI foi igual a 0,75 (três dos quatro genes metilados), em doze casos (31,6%) o MI foi igual a 0,5 (dois dos quatro genes metilados), em três casos (7,9%) o MI foi igual a 0,25 (um dos quatro genes metilados) e em quatro casos (10,5%) o MI foi igual a 0 (nenhum dos quatro genes metilados).

Em seguida, os casos foram separados em dois grupos: um que inclui MI maior ou igual a 0,25 e menor ou igual a 0,5 e outro que inclui MI maior ou igual a 0,75 e foram desafiados pelo método de Kaplan-Meier, tentando-se estabelecer uma correlação entre índice de metilação e recidiva, essa correlação não foi estatisticamente significativa.

CASO	14-3-3σ	RARβ	APC	E-CAD	MI
1					0,75
2					0,5
3					1
4					0,75
5					0,75
6					0,75
7					1
8					0,75
9					0,75
10					0,5
11					0,5
12					0,25
13					0,75
14					0,5
15					0,25
16					0,75
17					0,5
18					0,5
19					0
20					0
21					1
22					0,75
23					0,75
24					0,75
25					0,25
26					0,75
27					0,5
28					0
29					0,75
30					0,5
31					0,75
32					0,5
33					0,5
34					0,75
35					0
36					0,5
37					0,75
38					0,5

Figura 7 - Perfil de metilação e índice de metilação da região promotora dos genes *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC* e *E-CAD* nas amostras tumorais dos trinta e oito pacientes incluídos neste estudo. O índice de metilação (MI) foi calculado dividindo-se o total de genes metilados pelo total de genes analisados. Caixas pretas, amostras que são metiladas. Caixas brancas, amostras que são não-metiladas.

4.7 AMOSTRAS DE URINAS

Em uma amostra de urina há, em média, cinco mil células normais por mL que se desprenderam do epitélio da bexiga. Segundo SIDRANSKY (1997), 50% ou mais do DNA presente em uma amostra de urina de pacientes com câncer de bexiga (considerando células e DNA-livre de células) é proveniente de descamação de células do tumor.

Amostras de DNA provenientes das urinas de quatro pacientes com câncer de bexiga foram tratadas com bissulfito de sódio e submetidas à MSP para se avaliar o perfil de metilação da região promotora dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* com o objetivo de detectar células neoplásicas na urina. Os tumores de bexiga, desses mesmos pacientes, também foram analisados.

Conforme podemos observar na figura 8 houve uma concordância quase perfeita entre os perfis de metilação obtidos nas amostras provenientes das urina e dos tumores. A única discordância se deu no caso 36, no qual foi observada metilação na região promotora do gene *14-3-3 σ* na amostra de urina que não havia sido observada em seu tumor correspondente.

As amostras de DNA provenientes de urina utilizadas neste experimento encontravam-se estocadas no laboratório pois estas urinas haviam sido coletadas para outro estudo e as datas das coletas não estavam identificadas, portanto, há a possibilidade de as urinas não corresponderem ao tumor analisado e sim a uma recidiva. Neste caso, como a progressão tumoral acumula alterações genéticas, o fato de poder se estar analisando a urina de um segundo tumor, posterior ao tumor

analisado, poderia justificar a presença das novas alterações encontradas na urina em relação ao tumor correspondente.

CASO	14-3-3σ	RARβ	APC	E-CAD
32 Ur ^a				
32				
34 Ur				
34				
35 Ur				
35				
36 Ur				
36				

Figura 8 - Perfil de metilação da região promotora dos genes *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC*, *E-CAD*, *DAPK*, *GSTP1*, *HCAD*, *P14*, *P16*, *MGMT* e *TIMP3* em amostras de urina e dos tumores correspondentes de dois pacientes. (Ur) amostras de urina. Caixas pretas, amostras que são metiladas. Caixas brancas, amostras que são não-metiladas.

Visando estabelecer a sensibilidade de um possível teste para detecção do perfil de metilação em promotores gênicos em urinas de pacientes com câncer de bexiga, realizamos um experimento de MSP com diluições seriadas em urina da linhagem celular T24, cujo padrão de metilação da região promotora do gene *RARβ* já havia sido previamente estabelecido. A urina de um voluntário saudável foi colhida. Foram feitas diluições seriadas adicionando-se a 200μL urina normal quantidades decrescentes das células T24: $7,2.10^4$, $7,2.10^3$, $7,2.10^2$, $7,2.10^1$, $7,2.10^0$, $7,2.10^{-1}$, $7,2.10^{-2}$. Foram extraídos os DNAs das diferentes diluições. Como controles negativos utilizou-se urina do mesmo doador e solução fisiológica (NaCl 0,9%) sem adição das células e como controle positivo, $1,8.10^5$ células T24 diluídas em 200μL de solução fisiológica. A presença de DNA nas amostras extraídas foi confirmada pela amplificação por PCR do gene *hMLH-1* utilizando *primers* intrônicos para este gene. Conforme pode-se observar na figura 9, o método de extração de DNA

empregado permitiu obter-se DNA de todas as diluições, até daquelas com menor concentração de células: $7,2 \cdot 10^{-2}$ células provenientes da linhagem celular em 200 μ L de urina normal. Também foi possível extrair DNA da amostra de urina pura (sem adição de células T24).



Figura 9 - Reação de PCR com primers intrônicos para o gene hMLH-1, usando como molde o DNA extraído das diferentes diluições da linhagem celular T24 em 200mL de urina normal. (L) marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen), (1) $7,2 \cdot 10^4$, (2) $7,2 \cdot 10^3$, (3) $7,2 \cdot 10^2$, (4) $7,2 \cdot 10^1$, (5) $7,2 \cdot 10^0$, (6) $7,2 \cdot 10^{-1}$, (7) $7,2 \cdot 10^{-2}$, (8) urina pura, (9) $1,8 \cdot 10^5$ células diluídas em solução fisiológica, (10) solução fisiológica pura, (11) DNA genômico (controle positivo da reação), (12) controle negativo sem DNA.

Os DNAs obtidos a partir das diluições foram submetidos ao tratamento de bissulfito de sódio e subsequente MSP com os *primers* correspondentes à região promotora do gene *RAR β* .

Alelos não metilados eram esperados na urina normal, fato explicado pela presença de células normais, provenientes da descamação habitual do epitélio da bexiga. Foi possível detectar a presença de alelos não-metilados em todas as amostras, inclusive na amostra de urina pura. Por outro lado, alelos metilados foram detectados apenas nas amostras com até $7,2 \cdot 10^3$ células da linhagem T24. Nas diluições a partir de $7,2 \cdot 10^2$ células não foi possível a amplificação de nenhum produto utilizando-se os *primers* para a condição metilada (Figura 10). Portanto, estes resultados indicam que o limite de sensibilidade do método empregado é de 7.000 células, ou seja, este método precisa que a amostra a ser analisada possua, no mínimo, esta quantidade de células neoplásicas, para que o resultado possa ser positivo.

PALMISANO et al. (2000), estudando a detecção de metilação em escarro de pacientes portadores de câncer de pulmão, propuseram que, para o aumento de sensibilidade da MSP se fizesse uma segunda reação de MSP com o produto da primeira, para tanto os *primers* da primeira reação eram maiores e reconheciam a sequência modificada pelo bissulfito de sódio, mas não faziam distinção entre a situação metilada e não metilada e somente na segunda reação os *primers* eram capazes de fazer esta distinção. Essa *nested* MSP aumentou a sensibilidade da detecção em mais de cinquenta vezes. Como tentativa, realizamos uma *nested* MSP para aumentar a sensibilidade de detecção de células cancerosas nas amostras de urina. No entanto, foram utilizados os mesmos *primers* na primeira e na segunda reação. Essa *nested* MSP não conferiu nenhuma vantagem na detecção, o limite mínimo foi o mesmo de $7,2 \cdot 10^3$ células.

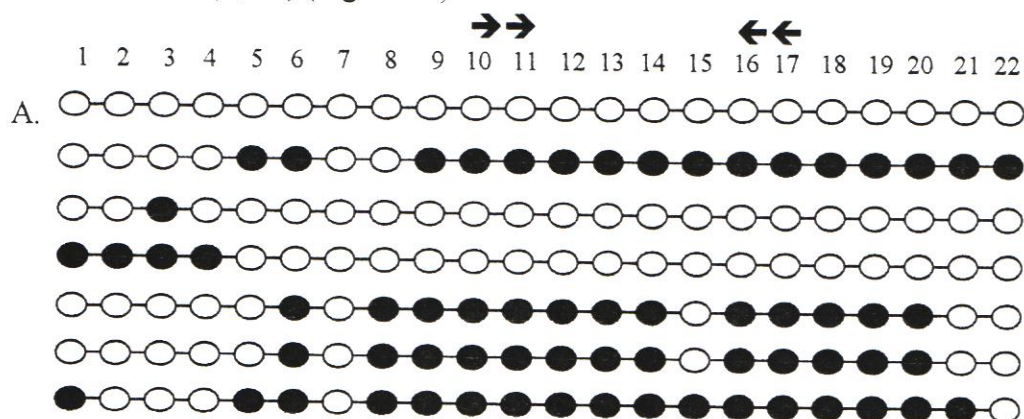


Figura 10 - Reação de MSP com os *primers* para a situação metilada do gene *RARβ* nas diferentes diluições da linhagem celular T24 em 200mL de urina normal. (L) marcador de peso molecular 100bp (Invitrogen), (1) $7,2 \cdot 10^4$, (2) $7,2 \cdot 10^3$, (3) $7,2 \cdot 10^2$, (4) $7,2 \cdot 10^1$, (5) $7,2 \cdot 10^0$, (6) $7,2 \cdot 10^{-1}$, (7) $7,2 \cdot 10^{-2}$, (8) urina pura, (9) $1,8 \cdot 10^5$ células diluídas em solução fisiológica, (10) controle negativo sem DNA.

4.8 PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ADAM23*

A partir do DNA genômico isolado de cinco linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga: T 24, SW 780, HT 1376, J82 e SCABER foram amplificados fragmentos de 390pb que continham vinte e dois dinucleotídeos CG contidos na ilha de CpG localizada na região promotora do gene *ADAM23*. Estes fragmentos foram clonados no plasmídeo pCR®2.1 (*Invitrogen*) e, posteriormente, estas construções foram utilizadas para transformar bactérias *E. coli*. Foram seqüenciados sete clones provenientes de cada uma das cinco linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga. A figura 11 mostra que o padrão de metilação variou, não só de linhagem para linhagem, mas também de clone para clone oriundo da mesma linhagem.

Cada uma apresentou diferentes padrões de metilação considerando cada um dos vinte e dois dinucleotídeos CG contidos na ilha de CpG localizada na região promotora do gene *ADAM23*. A linhagem que apresentou maior densidade de metilação foi a linhagem T 24 (41,6%), seguida pela linhagem SW 780 (13%), enquanto as linhagens HT 1376 e J82 não apresentaram nenhum dinucleotídeo CG metilados. A linhagem SCABER apresentou metilação em apenas dois dinucleotídeos (3,9%) (Figura 11).



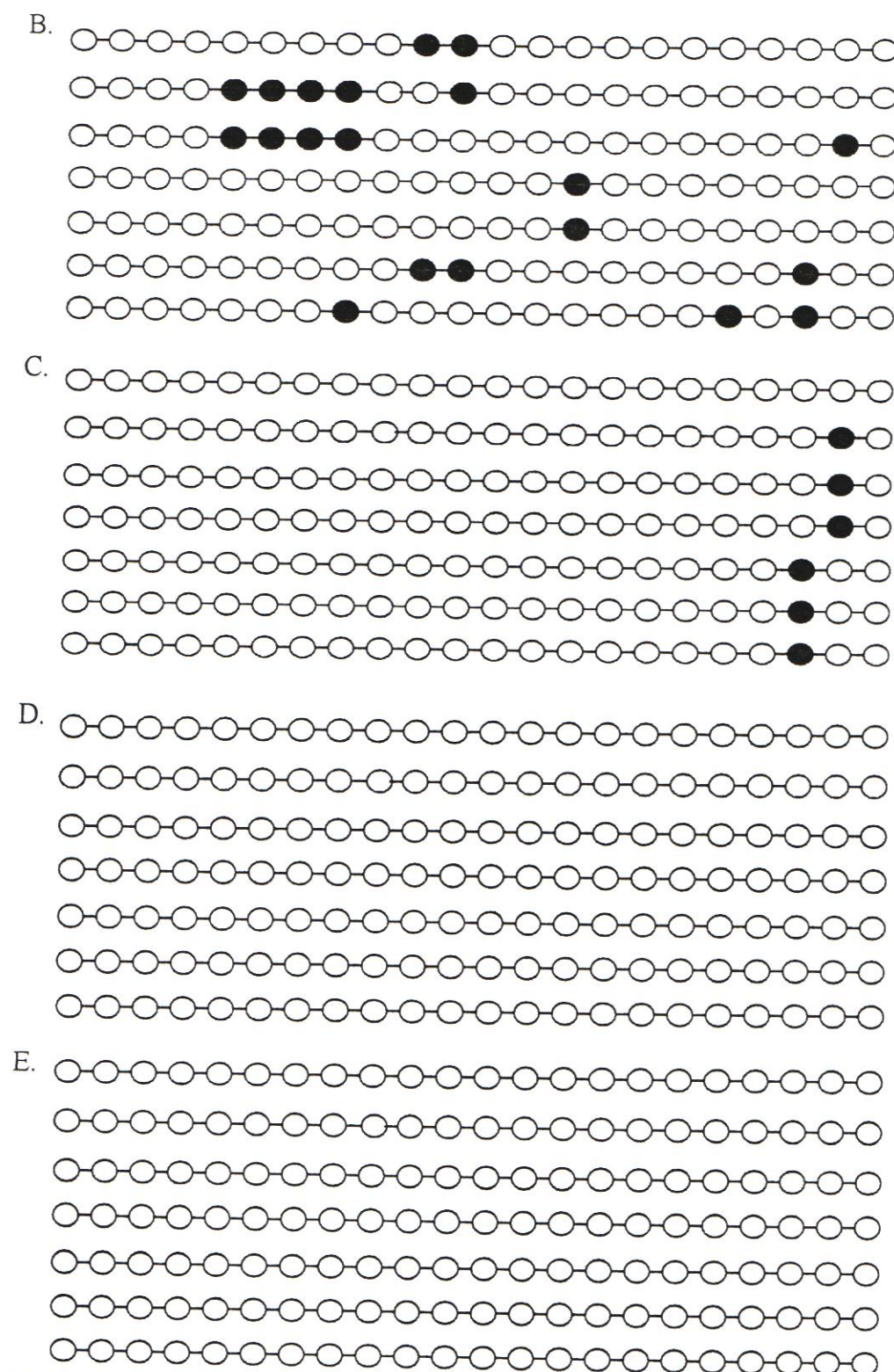


Figura 11 - Mapa de metilação da ilha de CpG localizada na região promotora do gene *ADAM23*. Vinte e dois dinucleotídeos CG na ilha de CpG estão indicados. Os DNAs foram tratados com bisulfito de sódio, amplificados clonados no vetor pCR®2.1 (*Invitrogen*) e depois analisados por seqüenciamento. A. Linhagem T24. As setas representam os *primers* desenhados para MSP. B. Linhagem SW 780. C. Linhagem SCABER. D. Linhagem J82. E. Linhagem HT 1376. Em branco, dinucleotídeos não-metilados e, em preto, dinucleotídeos metilados.

A partir dos resultados de seqüenciamento, decidiu-se implementar o método de MSP para a avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM23* em amostras tumorais. Para tanto, foram desenhados *primers* que permitissem a distinção entre presença e ausência de metilação em regiões específicas do promotor do gene *ADAM23*. As regiões escolhidas foram aquelas evidenciadas pelo experimento de seqüenciamento por conterem um maior número de dinucleotídeos CG mais freqüentemente metilados. Os *primers* diretos contêm os dinucleotídeos “10 e 11” enquanto que os *primers* reversos contêm os dinucleotídeos “16 e 17” (Figura 11). Foram desenhados 2 *primers* diretos, um complementar à seqüência metilada e outro para a condição não-metilada, na qual os dinucleotídeos CG são convertidos em TG. O mesmo ocorreu com os *primers* reversos. As condições de reação de PCR foram as mesmas utilizadas para os outros genes estudados e as temperaturas de anelamento utilizadas foram de 60°C para os dez primeiros ciclos, 58°C para os próximos dez ciclos e 56°C para os últimos quinze ciclos.

Os resultados da MSP realizada com as linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga mostram que apenas as linhagens T 24 e SW 780 apresentaram metilação na sua região promotora (figura 12). Este dado está de acordo com os resultados obtidos no experimento de seqüenciamento, pois essas duas linhagens foram as únicas que apresentaram os dinucleotídeos CG, incluídos nas seqüências dos *primers* desenhados, metilados. Estes resultados atestaram que o método de MSP para avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM23* foi desenvolvido e implementado com sucesso e agora pode ser empregado para avaliar o perfil de metilação deste gene em diferentes tipos de tumores.



Figura 12 - Ensaio de MSP para determinação do *status* de metilação do gene *ADAM23* em linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga: (T) T 24, (W) SW 780, (H) HT 1376, (S) SCABER e (J) J82. (N) controle negativo sem DNA, (L) marcador de peso molecular 100bp, (M) situação metilada e (U) situação não-metilada.

Foi realizado um experimento de MSP com DNA extraído de quatro amostras de tecido, sendo duas de tumor e duas de tecido normal. Este experimento mostrou a ausência de metilação na região promotora do gene *ADAM23* tanto nas amostras normais como nas tumorais. Em seguida, foi realizado um experimento de RT-PCR para avaliar a expressão desse gene nestas mesmas amostras de tecidos e, conforme podemos observar na figura 13A, foi possível detectar a expressão do gene *ADAM23* tanto em tecido proveniente de bexiga normal, quanto de bexiga tumoral. Como controle negativo, foi incluído no experimento cDNA obtido a partir da linhagem celular de mama tumoral MCF-7, que não apresenta expressão do gene *ADAM23* devido a metilação do seu promotor COSTA et al. (comunicação pessoal). Também foi realizada uma RT-PCR com *primers* para o gene constitutivo GAPDH, para confirmar a integridade dos cDNAs analisados e todas as amostras se mostraram adequadas para análise (Figura 13B). Todos estes resultados demonstram o perfeito alinhamento entre os dados obtidos nos experimentos de MSP e de RT-PCR, pois uma vez que a região promotora do gene não se encontra metilada, é de se esperar poder detectar a expressão do gene *ADAM23* nestas amostras.

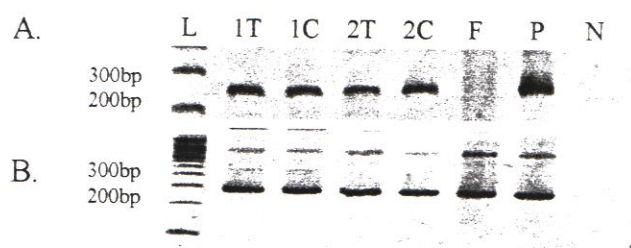


Figura 13 - Ensaio de RT-PCR para verificar a expressão do gene *ADAM23*. O RNA total de duas amostras de dois tumores de bexiga (1T e 2T) e dois tecidos normais correspondentes (1C e 2C) foram extraídos pelo método do trizol. 2 microgramas deste RNA serviram de molde para a síntese de cDNA pela ação da Transcriptase reversa. A presença de transcritos do gene *ADAM23* foi avaliada através de reação de PCR. A linhagem celular MCF-7 (F), por não apresentar expressão do gene *ADAM23*, foi utilizada como controle negativo. A linhagem celular PCM42 (P) foi utilizada como controle positivo. (N) controle negativo sem DNA, (L) marcador de peso molecular 100bp. A. RT-PCR para o gene *ADAM23*. B. RT-PCR para o gene *GAPDH*.

Por último, foi realizada um ensaio de MSP para verificação do *status* de metilação na região promotora do gene *ADAM23* em dez amostras provenientes de tumores de bexiga (dados não apresentados) e todas elas apresentaram o padrão não-metilado. Portanto, embora o gene *ADAM23* tenha apresentado seu promotor metilado em duas linhagens derivadas de câncer de bexiga, parece não ser um evento freqüente nos tumores de bexiga.

5 DISCUSSÃO

Há evidências crescentes de que a hipermetilação do DNA tem um papel importante no silenciamento gênico que ocorre no câncer. Na carcinogênese de bexiga, diferentes alterações genéticas têm sido consideradas importantes e parecem participar efetivamente desse processo. Algumas delas estão bem estabelecidas e incluem deleções no cromossomo 9 (tanto braço curto quanto braço longo), que ocorre em mais de 60% das neoplasias de bexiga e parecem ser eventos precoces; mutações em genes supressores de tumor como no gene *Rb* (gene do Retinoblastoma), possivelmente em 30% dos casos e no gene *P53* que ocorre em mais de 50% dos carcinomas de células transicionais; deleção e perda de expressão do gene *P16*; instabilidades de microssatélites; expressão aumentada do oncogene *c-erb-B2*; mutações no oncogene *H-ras*, identificada em mais de 35% dos tumores de bexiga; expressões anormais de receptores de fatores de crescimento no urotélio em pacientes com carcinoma de células transicionais; expressão reduzida da molécula de adesão E-caderina; neoangiogênese; entre outros (Jung & Messing 2000). Os mecanismos epigenéticos de inativação gênica por hipermetilação em regiões promotoras de determinados genes (principalmente genes com função de supressão tumoral) ainda não foram incluídos nessas alterações bem estabelecidas na participação da tumorigênese do câncer de bexiga, mas a sua importância para esse tipo de neoplasia vem sendo muito estudada (GONZALGO et al. 1998; MARUYAMA et al. 2001; CHAN et al. 2002; DOMINGUEZ et al. 2002; TADA et al. 2002) e certamente, esses mecanismos desempenham papéis importantes em pelo

menos parte desses tumores. Estudos como o nosso podem adicionar informações pertinentes, ajudando a esclarecer a importância desse mecanismo na carcinogênese de bexiga.

O presente trabalho analisou a hipermetilação da região promotora de um painel de onze genes (*14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC*, *E-CAD*, *DAPK*, *GSTP1*, *H-CAD*, *P14*, *P16*, *MGMT* e *TIMP-3*) em trinta e oito amostras de tumores de bexiga. Os quatro genes que apresentaram a sua região promotora mais freqüentemente metilada foram: *14-3-3 σ* (68,4%), *RAR β* (60,5%), *APC* (57,9%) e *E-CAD* (42,1%). Os outros sete genes apresentaram metilação em menos de 15% das amostras analisadas. A hipermetilação no promotor de *14-3-3 σ* nunca foi avaliada antes em amostras de tumor de bexiga e neste estudo, esse foi o gene que apresentou a maior freqüência de metilação. Considerando os quatro genes mais freqüentemente metilados, em 89,5% dos pacientes foi possível detectar metilação em pelo menos um dos quatro genes, sendo que 81,6% apresentaram pelo menos dois genes metilados, 50% pelo menos três dos genes metilados e cerca de 8% dos pacientes apresentaram os quatro genes metilados. Essas porcentagens indicam que a freqüência de metilação nos tumores estudados é alta e, além disto, a análise do *status* de metilação desses quatro genes conjuntamente permite uma maior eficácia na detecção de tumores de bexiga do que quando se analisa cada gene isoladamente. Correlacionando os achados moleculares e os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes, foi possível estabelecer com significância estatística, a relação da presença de metilação na região promotora do gene *E-CAD* e uma maior freqüência de metástases, confirmada com o teste de Kaplan Meier, que mostrou que os pacientes que apresentam essa alteração nesse gene, apresentaram menor tempo de sobrevida livre de metástase. Subdividindo o

estadio 1 em T1 e Ta (mais superficial), houve a correlação estatisticamente significativa entre a metilação da região promotora do gene *14-3-3σ* e T1, a subdivisão mais avançada. Também houve uma correlação que mostrou uma tendência dos tumores de estadio 2, 3 e 4 apresentarem metilação da região promotora do gene *APC*, em relação ao estadio 1, o qual é menos avançado.

Recentemente foram publicados trabalhos que avaliaram o papel da hipermetilação da região promotora de um painel de genes em câncer de bexiga.

MARUYAMA et al. (2001) analisaram o perfil de metilação nas regiões promotoras de um painel de dez genes (*RASSF1A*, *RAR β*, *APC*, *P 16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD*, *H-CAD* e *FHIT*) em noventa e oito tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga. Eles observaram quatro genes mais frequentemente metilados nas amostras de tumores: *E-CAD* (36%), *RASSF1A* (35%), *APC* (35%) e *H-CAD* (29%). Este trabalho também mostrou que 78% dos tumores analisados apresentaram metilação em 1 ou mais genes deste painel, sendo que, em 16% dos pacientes foi detectada metilação em quatro a sete genes deste painel. Analisando os dados clínico-patológicos, foi possível estabelecer uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *E-CAD* metilado e uma menor sobrevida. A partir da publicação desse estudo, optamos pela inclusão de mais dois genes (*H-CAD* e *APC*) no nosso trabalho. Dos genes por eles analisados, nós não analisamos apenas os genes *FHIT* e *RASSF1A*.

Em fevereiro de 2002, CHAN et al. publicaram um estudo em que foi analisado um painel de sete genes (*RARβ*, *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD* e *P15*) em noventa e oito tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga. Eles observaram quatro genes mais frequentemente metilados nas amostras de tumores:

RARβ (87,8%), *E-CAD* (63,3%), *DAPK* (58,2%) e *P16* (26,5%). Eles também analisaram vinte e duas amostras de urinas correspondentes aos tumores. Foi detectada metilação em pelo menos um dos quatro genes mais frequentemente metilados em 100% dos tumores enquanto que 20% dos tumores apresentaram mais do que três genes metilados simultaneamente. No caso das amostras de urina, vinte das vinte e duas amostras analisadas apresentaram metilação, sendo que todos os achados nas urinas foram correspondentes aos achados nos tumores dos mesmos pacientes. Eles demonstraram que a detecção pela urina é factível e, de acordo com os resultados obtidos, essa detecção é mais sensível do que a citologia convencional. Dos genes analisados por eles, nós não analisamos apenas o gene *P15*.

Um outro trabalho significativo feito com tumor de bexiga foi o de DOMINGUEZ et al. (2002) mostrando a detecção da hipermetilação da região promotora do gene *P14* em amostras de tumores e de DNA de plasma correspondentes. Quinze das vinte e sete amostras de tumores mostraram-se metiladas para *P14* e das amostras de plasma correspondentes, treze das quinze que apresentaram metilação nas amostras tumorais, com uma concordância de 87%. Analisando dados clínico-patológicos, foi estabelecida uma correlação significativa entre a metilação de *P14* e a presença de focos multicêntricos, tumores maiores e recidivas. Eles também analisaram o gene *P16*, mas não acharam dados significativos.

Também em 2002, TADA et al. analisaram a hipermetilação da região promotora de um painel de sete genes (*hMLH1*, *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD* e *VHL*) em cinquenta e cinco tumores de bexiga e acharam as frequências de 48% para *E-CAD*, 29% para *DAPK*, 17% para *MGMT*, 13% para *hMLH1* e *GSTP1*,

11% para *P16* e 4% para *VHL*. Eles observaram que 73% dos tumores exibiam hipermetilação em pelo menos um dos genes analisados, sendo que, 41% apresentavam apenas um gene metilado, 15%, dois genes, 5%, três genes e 9% apresentavam mais de três genes com suas regiões promotoras hipermetiladas. Correlacionando os achados moleculares com os parâmetros clínico-patológicos, foi observada 77% de hipermetilação simultânea de três genes ou mais no grupo de pacientes que desenvolveu recidiva. Foi possível estabelecer uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *DAPK* hipermetilado e maior frequência de recidiva, pois 88% dos pacientes que apresentavam essa hipermetilação recidivaram em quinze meses e 71% dos pacientes que não apresentaram a hipermetilação não recidivaram no período de vinte e quatro meses. Os autores sugerem que a hipermetilação da região promotora do gene *DAPK* parece ser um forte indicador de desenvolvimento de recorrência da doença e poderia ser usado como marcador molecular para diagnosticar a doença durante o seguimento após uma ressecção transuretral. Dos genes analisados por eles, nós não analisamos apenas os genes *hMLH1* e *VHL*.

Esses trabalhos são essenciais para enfatizar a importância e a relevância de estudar a detecção da hipermetilação de genes envolvidos na supressão tumoral em tumores de bexiga, não somente pela sua potencial importância prognóstica, como também pela sua possível e factível detecção em fluidos corpóreos, reforçando o seu potencial como marcador molecular para identificação de câncer. No entanto, os trabalhos realizados, cujos resultados acabamos de expor, necessitam de confirmações e os dados de frequência apresentados não coincidem entre eles, portanto, o nosso trabalho pode somar informações importantes. As populações

estudadas pelos autores dos quatro artigos acima citados são diferentes (americana, chinesa, espanhola e japonesa), o que poderia explicar a diferença nas frequências. O nosso trabalho foi realizado com uma população diferente das já estudadas (brasileira), o que permitiu observar, de imediato, que ela apresenta um padrão de metilação diferente dos já publicados. Além disso, analisamos dois genes que ainda não haviam sido analisados em tumores de bexiga: *14-3-3 σ* e *TIMP-3*. Esse fator também distingue nosso trabalho dos demais, colocando-o como importante contribuição para o panorama atual da pesquisa nesta área.

Considerando a hipermetilação na região promotora do gene *E-CAD*, avaliada em três dos trabalhos acima citados e também neste, ela sempre se apresentou como uma das quatro mais frequentemente metiladas, o que poderia indicar a importância desse mecanismo epigenético de inativação gênica na tumorigênese do câncer de bexiga. MARUYAMA et al. (2001) observaram uma frequência de 36%, CHAN et al. (2002) de 63,3%, TADA et al. (2002) de 48% e neste trabalho foi observada a frequência de 42,1%.

A frequência de hipermetilação na região promotora do gene *APC*, foi estimada por MARUYAMA et al. (2001) em 35%. Os dados gerados por este trabalho mostram uma frequência de 57,9% para este gene. Esta diferença pode ser explicada pela diferença étnica entre as populações analisadas (americana e brasileira, respectivamente). O gene *APC* ainda não foi avaliado nas outras populações.

Na região promotora do gene *H-CAD*, MARUYAMA et al. (2001) observaram uma frequência de 29%, sendo este um dos quatro genes mais

freqüentemente metilados descritos naquele trabalho. Já em nosso trabalho, a metilação neste gene apresentou uma freqüência mais baixa, de 10,5%.

No caso da região promotora do gene *RAR β* , CHAN et al. (2002) encontraram, em 87,8% das amostras analisadas, a região promotora metilada. Por outro lado, o estudo de MARUYAMA et al. (2001) determinou uma freqüência de metilação para este gene de apenas 11%. Os dados encontrados por nós indicam uma alta freqüência de metilação da região promotora do gene *RAR β* na população brasileira (60,5%), fato este que corrobora os achados de CHAN et al. (2002) e sugere a importância dessa alteração em tumores de bexiga.

Para o gene *DAPK*, as freqüências encontradas foram bastante divergentes: 4% no trabalho de MARUYAMA et al. (2001), 13,2% no presente trabalho, 29% no trabalho de TADA et al. (2002) e 58,2% no trabalho de CHAN et al. (2002). Nos dois últimos trabalhos, este gene aparece entre os quatro genes mais freqüentemente hipermetilados. A divergência de resultados entre os trabalhos levanta dúvidas sobre a real importância da participação dessa alteração na carcinogênese dos tumores de bexiga.

As freqüências de hipermetilação encontradas para o gene *P16* são mais concordantes entre os diferentes trabalhos, sendo 7% (MARUYAMA et al. 2001), 11% (TADA et al. 2002), 10,5% no presente trabalho e um valor mais alto de 26,5% (CHAN et al. 2002). Esse mecanismo não parece ser importante na inativação desse gene em câncer de bexiga, o que já era esperado uma vez que se tem conhecimento de que há uma alta freqüência de deleções nesse gene em câncer de bexiga (ORLOW et al. 1998).

Para o gene *MGMT*, as frequências são semelhantes e parecem demonstrar que o mecanismo de hipermetilação desse gene não é frequente na carcinogênese do tumor de bexiga. Foram elas: 2% (MARUYAMA et al. 2001), 5,1% (CHAN et al. 2002), 10,5% neste trabalho e a maior de 17% (TADA et al. 2002).

A região promotora do gene *GSTP1* apresentou baixas e concordantes frequências de hipermetilação em todos os trabalhos: 11% no de MARUYAMA et al. (2001), 5,1% no de CHAN et al. (2002), 13% no de TADA et al. (2002) e 10,5% no nosso trabalho. Essa alteração, entretanto, é frequentemente encontrada associada com câncer de próstata (CAIRNS et al. 2001; JERÓNIMO et al. 2002). E considerando as baixas frequências encontradas em câncer de bexiga, pode-se dizer que este é um marcador molecular em potencial para o câncer de próstata uma vez que se mostra tecido específico (comparando esses dois tecidos) e não haveria confusão de diagnóstico, mesmo entre órgãos tão próximos, podendo a detecção ocorrer em um mesmo fluido corpóreo, ou seja, a urina.

A frequência de 75% de hipermetilação na região promotora do gene *P14* encontrada por DOMINGUEZ et al. (2002) é totalmente discordante da encontrada neste trabalho, que foi de 10,5%. Uma vez que os outros trabalhos não analisaram esse gene, não é possível concluir se essa alteração é importante em câncer de bexiga.

O presente estudo encontrou o gene *14-3-3 σ* como sendo o mais frequentemente metilado nos tumores analisados (68,4%), o que parece sugerir uma grande importância dessa alteração epigenética neste gene em tumores de bexiga. A hipermetilação da região promotora deste gene já havia sido detectada em taxas significativas em câncer de mama (FERGUSON et al. 2000; UMBRICHT et al.

2001), câncer gástrico (SUZUKI et al. 2000), câncer de vulva (GASCO et al. 2002b) e câncer oral (GASCO et al. 2002a), porém, nenhum outro grupo analisou o perfil de metilação deste gene em câncer de bexiga, portanto ainda não se pode concluir que essa alteração seja importante, mas, se estes dados se confirmarem, esta descoberta pode constituir uma das contribuições deste trabalho para a compreensão do mecanismo epigenético de inativação gênica na tumorigênese do câncer de bexiga.

Estudando câncer colorretal, TOYOTA et al. (1999) propuseram a existência de um fenótipo metilador o qual ocorreria em um grupo de tumores, que apresentariam um processo alternativo de carcinogênese. Esses tumores teriam tendência ao silenciamento de genes devido à ocorrência de metilação nas suas regiões promotoras, com o potencial de inativar múltiplos genes supressores de tumor simultaneamente por essa via. O grupo de tumores com fenótipo metilador parece apresentar diferentes alterações genéticas e conseqüentemente, diferente comportamento biológico quando comparados aos tumores que não apresentam esse fenótipo metilador. Por isso, a determinação das alterações genéticas e epigenéticas dos tumores pode ser extremamente importante na previsão do prognóstico e planejamento de estratégias terapêuticas no futuro. Por exemplo, o grupo de pacientes com tumores com fenótipo metilador poderia se beneficiar de tratamentos baseados em drogas inibidoras da metilação, enquanto o grupo de tumores em que predominam as alterações decorrentes de instabilidade cromossômica (aneuploidia) ou instabilidade genômica (mutações) devem ser mais sensíveis a outros tipos de drogas. Os autores sugerem que esse modelo poderia ser aplicado a outros tipos de câncer além do colorretal e que decifrar esse fenômeno poderia facilitar a previsão do prognóstico de cada paciente. Certamente, mais estudos são necessários para

esclarecer as causas e implicações das alterações epigenéticas na carcinogênese humana, mas estudos em que a frequência dessas alterações em diferentes tipos tumorais são determinadas contribuem para o direcionamento desses estudos. Na nossa casuística, podemos observar que a distribuição da frequência de metilação nos genes estudados varia de maneira que a maioria (70,9%) dos pacientes apresenta de dois a 4 genes metilados. Entretanto, quatro pacientes (10,4%) não apresentaram nenhum dos promotores gênicos estudados hipermetilados. Seria interessante estudar em um grupo maior de pacientes outras alterações genéticas que ocorrem frequentemente na carcinogênese vesical, como deleção de 9p e 9q, mutações em *P53*, e amplificação de *c-erbB2*, entre outras e correlacionar essas alterações com a ocorrência de hipermetilação e com a evolução desses pacientes. Com isso, poderíamos determinar a ocorrência de tumores com evolução diferente dependendo das alterações genéticas presentes.

Nossos resultados sugerem que a frequência da hipermetilação na região promotora dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* é alta nos tumores de bexiga e parece ter importância na tumorigênese desse tipo de câncer.

É importante ressaltar que o pequeno número de casos usado para as análises dos achados moleculares, pode não refletir a realidade da tumorigênese do câncer de bexiga. No entanto, a significância estatística demonstra uma tendência de divisão em grupos com diferentes características, o que permitiu a interpretação dos resultados deste trabalho. A extensão do estudo com a inclusão de mais casos possibilitará a confirmação desses achados.

Correlacionando os achados moleculares com os parâmetros clínico-patológicos dos pacientes, foi possível estabelecer com significância estatística, a

relação da presença de metilação na região promotora do gene *E-CAD* e uma maior frequência de metástases. O método de Kaplan Meier mostrou que os pacientes que apresentam essa alteração nesse gene, apresentaram menor tempo de sobrevida livre de metástases. A proteína codificada por este gene é uma glicoproteína transmembrana que modula a adesão intercelular dependente de cálcio, a perda da sua expressão parece estar relacionada com propriedades invasivas e metastáticas das células neoplásicas, o que é consistente com a idéia de gene supressor de tumor (KOIZUME et al. 2002). Portanto a metilação da região promotora do gene *E-CAD* parece ser um mecanismo pelo qual acontece a inativação desse gene, permitindo assim a migração das células para novos focos, ou seja, a ocorrência de metástases. MARUYAMA et al. (2001) estabeleceram uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *E-CAD* metilado e um menor tempo de sobrevida global, ou seja, um pior prognóstico. Apesar dos dados apresentados no presente estudo relacionarem a hipermetilação desse gene a um menor tempo de sobrevida livre de metástases, a metilação no promotor do gene *E-CAD*, também conferiu um pior prognóstico. É importante lembrar que a população estudada em nosso trabalho apresentou um baixo número de óbitos (seis em trinta e oito casos) e este fato dificultou o estabelecimento efetivo de correlações dos dados moleculares com sobrevida global. Os dados encontrados sugerem a metilação do gene *E-CAD* como marcador molecular em potencial de pior prognóstico em pacientes portadores de câncer de bexiga. Estudos maiores, com um maior número de pacientes, são necessários para a confirmação desses dados.

O gene *APC* é um gene supressor de tumor e a perda das suas funções parece estar relacionada a perda do controle da proliferação celular (TSUCHIYA et al.

2000), o que é uma característica importante na proliferação de células neoplásicas. Neste estudo a metilação no promotor desse gene mostrou uma tendência de associação com estadios mais avançados: 2,3 e 4 em relação ao estadio 1. A presença dessa alteração no gene *APC* parece participar da sua inativação em um momento de progressão dos tumores de bexiga, passando do estadio 1 aos mais avançados.

A metilação da região promotora do gene *14-3-3 σ* se correlacionou estatisticamente com a subdivisão mais avançada do estadio 1. Na nossa casuística, quando o estadio 1 foi subdividido em Ta (mais superficial) e T1 (mais avançado), todos os tumores que se apresentaram em T1 apresentaram metilação do promotor do gene *14-3-3 σ* . Esse gene codifica uma proteína que é reguladora de senescência de células epiteliais e que tem funções de controle no ciclo celular, parece estar envolvida em regulação do crescimento celular, diferenciação e transdução de sinal (SUZUKI et al. 2000). A perda da sua expressão sensibiliza as células a irradiação gama e a agentes quimioterapêuticos, exibindo anormalidades cromossômicas (GASCO et al. 2002a). As células também perdem a capacidade da sua permanência na fase G2 do ciclo celular (GASCO et al. 2002b). Essas características são consistentes com a idéia de gene supressor de tumor. Portanto, a sua inativação pela via epigenética, parece participar da carcinogênese de tumores de bexiga e, segundo os nossos dados, deve atuar no momento de progressão do tumor mais superficial para um estadio mais avançado.

Dois trabalhos de um mesmo grupo propuseram um índice de metilação (MI) para comparar a extensão de metilação no painel de genes analisados, possibilitando, assim a determinação da taxa global de metilação em cada amostra, individualmente (MARUYAMA et al. 2001; ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001). Esses índices

traduzem a hipermetilação simultânea dos genes considerados para esta análise. No trabalho de MARUYAMA et al. (2001), o grupo de tumores de bexiga com alto MI apresentou uma menor sobrevida (estatisticamente significativa) que o grupo com baixo MI, já em relação a intervalo livre de recidivas não foi possível estabelecer correlações. No nosso trabalho não foi possível estabelecer correlações entre MI e parâmetros clínico-patológicos.

O nosso trabalho mostrou que é possível a detecção de hipermetilação de regiões promotoras de genes alvos em urina. Foram analisadas quatro amostras de urinas correspondentes a amostras tumorais de quatro pacientes já analisados no presente estudo. Nessas urinas foram analisadas as regiões promotoras dos quatro genes mais frequentemente metilados nas amostras de tumores: *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD*. Os resultados foram discordantes em apenas em um caso, no qual foi observada metilação na região promotora do gene *14-3-3 σ* na amostra de urina que não havia sido observada em seu tumor correspondente. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que essas amostras de urina haviam sido coletadas para outro estudo, com finalidade diferente deste, portanto as datas das coletas não foram identificadas e por isso não se pode garantir que as urinas realmente correspondam ao tumor analisado e não a uma recidiva. Se considerarmos que a progressão tumoral acumula alterações genéticas e que a coleta da urina poderia ter sido feita na época de um tumor posterior ao analisado por este trabalho, a urina analisada poderia conter células que acumularam novas alterações em relação ao tumor primário. Também há a possibilidade desse fato ser devido à heterogeneidade do tumor e nesse caso, a parte amostrada para a análise do tumor não mostrou células com as mesmas alterações genéticas encontradas nas células descamadas da urina. Uma outra

possibilidade seria que o tumor tivesse focos multicêntricos, ou seja, vários tumores na bexiga e cada população independente de células neoplásicas teria alterações genéticas não necessariamente idênticas.

Como um dos nossos objetivos foi estabelecer o perfil de metilação dos tumores de bexiga para selecionar os genes mais freqüentemente metilados para comporem um painel para o diagnóstico de tumores de bexiga na urina, para esta finalidade, foram realizados testes com misturas artificiais de urina de um voluntário saudável e diferentes diluições de células provenientes de uma linhagem celular derivada de câncer de bexiga (T 24), da qual já havia sido estabelecido o *status* de metilação dos genes estudados. Foi escolhido o gene *RARβ* que apresentava metilação na sua região promotora nessa linhagem celular. A quantidade mínima de células cancerosas presentes na urina em que foi possível detectar, pelo método desenvolvido neste trabalho, a presença da hipermetilação foi de $7,2 \cdot 10^3$ células. Apesar de ser conhecida a quantidade de células desprendidas da bexiga em uma urina normal (em média cinco mil células por mL) e ser estimado que em urina de pacientes com câncer de bexiga, 50% ou mais do DNAs presentes (considerando células e DNA livre de células) são provenientes de descamação de células do tumor (SIDRANSKY 1997), não há estudos que determinem a quantidade de células tumorais descamadas na urina. Portanto, estudos posteriores deverão ser realizados na tentativa de se determinar o volume de urina de pacientes com tumores de bexiga necessário para que o protocolo desenvolvido funcione.

É importante ressaltar que apenas um método de extração de DNA foi avaliado neste teste, portanto, não se pode descartar que a melhoria no rendimento de DNA extraído por outros métodos não possa alterar a eficiência geral do protocolo

desenvolvido. Em nenhum dos outros estudos, nos quais também se fez a detecção de metilação na urina, apresentou-se os volumes de urina utilizados para a realização do teste. Por exemplo, CHAN et al. (2002) apenas dizem que a amostra foi centrifugada e a partir daí o DNA foi extraído pelos métodos convencionais. Outros trabalhos, que se basearam em detecção de câncer de bexiga por métodos que envolvem a extração de DNA de amostras de urina, citam quantidades necessárias para a realização do teste proposto. Um estudo de STEINER et al. (1997) mostrou a possibilidade de análise de microssatélites baseada em PCR em amostras de urina de pacientes que já haviam sido tratados para câncer de bexiga e essa análise foi capaz de detectar a recidiva da doença em 90,9% dos casos de quatro a seis meses antes da detecção por cistoscopia. Nesse estudo foram utilizados 50mL de urina para a extração de DNA. Outro estudo, que partiu de 50mL de urina, apresentou um teste de detecção em urina de perda de heterozigose no gene *P53*, em que todos os achados na urina foram correspondentes aos dos tumores dos mesmos pacientes (FRIEDRICH et al. 2000). SERIPA et al. (2001) demonstraram que a detecção de perda de heterozigose e instabilidade de microssatélites baseada em PCR se mostrou mais sensível que a citologia convencional para a detecção de câncer de bexiga. Para essa análise eles partiram de 100mL de urina para a extração de DNA. Outro estudo que também analisou perda de heterozigose e instabilidade de microssatélites para detectar câncer de bexiga foi capaz de detectar a doença em 75% dos casos de um a nove meses antes da detecção pela cistoscopia. Eles usaram de 8 a 200mL de urina para extrair DNA para a análise proposta (AMIRA et al. 2002). Em geral, nestes estudos foram utilizados de 50 a 100mL de urina para a extração de DNA, no entanto, é preciso destacar que para a detecção de metilação pode ser necessária uma quantidade maior

de DNA, uma vez que em seguida à extração, o DNA é submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, quando pode haver uma perda expressiva da quantidade de DNA. Primeiramente era estabelecida a quantidade mínima de 1µg de DNA para iniciar o tratamento (HERMAN et al. 1996); contudo, há relatos que sugerem ser possível realizar o tratamento de bissulfito de sódio e a subsequente MSP com sucesso, partindo de 10ng de DNA inicial (o que corresponde a 1.666 células) (CHAN et al. 2002). No nosso trabalho, a análise foi realizada com sucesso, partindo de amostras com quantidades de no mínimo aproximadamente 30ng (o que equivale a 4998 células).

Sobre a detecção da hipermetilação de regiões promotoras de genes alvos em amostras de urina, para a detecção de tumores de bexiga, CHAN et al. (2002) mostraram que esse procedimento é factível e registraram uma concordância de 90,9% entre as alterações encontradas neste fluido corpóreo e nos tumores dos mesmos pacientes, com especificidade de 76,4%. Esses valores foram comparados com citologia de urina, tradicionalmente utilizada para a detecção desse tipo de câncer, que apresentou, nesse mesmo estudo, sensibilidade de 45,5% e especificidade de 100%. Apesar de a citologia apresentar uma especificidade de 100% contra 76,4% da detecção de hipermetilação, a sensibilidade do teste proposto é significativamente maior: 90,9% contra 45,5% da citologia convencional, o que pode sugerir que a utilização conjunta desses dois testes traria um grande aumento na detecção da doença. CAIRNS et al. (2001), estudando a detecção de hipermetilação da região promotora do gene *GSTP1* em tumores de próstata, encontraram uma baixa sensibilidade (27%), ou seja a concordância das alterações presentes nas urinas e nos tumores foi baixa. Só foi possível identificar a metilação em seis dos vinte e dois

tumores que apresentavam essa alteração. No entanto, é preciso considerar que o desprendimento de células da próstata e do tumor de próstata é muito menor para a urina que no caso da bexiga, órgão em que esse fluido corpóreo é armazenado e de onde ele é expelido devido a contrações do músculo detrusor, que pressiona o epitélio e facilita a sua descamação. No trabalho citado, os autores propõem que uma massagem prostática poderia auxiliar no processo de descamação das células desse outro tipo de tumor para urina, o que facilitaria esse tipo de detecção.

Uma vez que o gene *ADAM23* foi encontrado metilado em tumores e linhagens celulares derivadas de câncer de mama por COSTA et al. (manuscrito em preparação), decidimos testar a importância desse evento na carcinogênese de bexiga. Esse teste foi parte importante deste trabalho, pois proporcionou a completa elaboração e realização de um modelo experimental para a detecção da presença de hipermetilação em um promotor gênico nunca antes estudado por MSP. O primeiro passo foi mapear as ilhas de CpG, presentes no promotor de interesse, mais frequentemente metiladas em linhagens derivadas do tumor-alvo (neste caso, tumor de bexiga). Para este mapeamento, o DNA foi extraído de diferentes linhagens celulares, tratado com bissulfato de sódio, clonado e sequenciado. Este passo é necessário uma vez que a frequência de metilação nas ilhas pode variar entre diferentes tumores. Posteriormente, como nosso teste se baseia em MSP, foi necessário desenhar *primers* nas regiões mais frequentemente metiladas e padronizar a reação de MSP. Houve uma correlação direta entre os resultados obtidos no sequenciamento e na MSP utilizando-se linhagens celulares, o que mostrou que a estratégia desenhada estava adequada. O perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM23* foi avaliado em dez tumores de bexiga e os resultados encontrados

demonstram que este gene provavelmente não sofre ação deste mecanismo epigenético de inativação neste tipo de tumor.

Em conclusão, o processo de silenciamento de genes devido à hipermetilação de seus promotores parece ser um evento freqüente e importante no câncer de bexiga. Segundo o nosso estudo, a metilação da região promotora dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* é importante na carcinogênese do tumor de bexiga e pode fazer parte de uma via de tumorigênese alternativa à descrita classicamente nesse tipo de tumor, conferindo diferentes características clínico-patológicas aos pacientes.

Sendo essa alteração freqüente, a busca da metilação em *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* pode ser usada como um possível marcador molecular. Foi demonstrado nesse estudo que é possível que a sua detecção seja feita em um fluido corpóreo (urina).

Esses achados abrem caminho para estudos posteriores com um maior número de pacientes para a confirmação dos dados obtidos e das suas correlações com parâmetros clínico-patológicos. Também serão necessários outros estudos nos quais seja analisado um maior número de amostras de urina provenientes de pacientes e seus tumores correspondentes e também de maneira prospectiva, acompanhando os pacientes e verificando a eficácia desse tipo de exame para a detecção precoce e confiável de recidivas e verificando a possibilidade da correlação dos achados moleculares com o prognóstico individual de cada paciente.

6 CONCLUSÕES

- Foram padronizadas condições para análise de hipermetilação da região promotora para amplificação por MSP dos onze genes selecionados para este estudo (*DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *RAR β* , *TIMP-3*, *14-3-3 σ* , *APC* e *H-CAD*). Posteriormente, foi determinado o *status* de metilação da região promotora destes genes em linhagens celulares e em amostras de tumores de bexiga.
- Demonstrou-se a possibilidade de extração de DNA a partir de amostras de tumores emblocadas em parafina para o estudo do padrão de metilação dos genes escolhidos com a mesma confiabilidade de DNAs extraídos de tumores congelados. A vantagem da utilização de amostras emblocadas em parafina reside no fato de que, geralmente, estas amostras são mais antigas e portanto apresentam um tempo de seguimento maior.
- Nas trinta e oito amostras de tumores de bexiga analisadas, os quatro genes que apresentaram as suas regiões promotoras mais freqüentemente metiladas nos tumores foram *14-3-3 σ* (68,4%), *RAR β* (60,5%), *APC* (57,9%) e *E-CAD* (42,1%). Nos outros sete genes restantes, as freqüências de metilação encontradas foram menores que 15%.
- A metilação do promotor do gene *E-CAD* se correlacionou, com significância estatística, com a maior ocorrência de metástase e este dado somado à sua alta freqüência indica o seu grande potencial como marcador molecular em câncer de bexiga.

- A presença de metilação no promotor do gene *14-3-3σ* parece estar relacionada à progressão de um tumor estadio 1 da sua fase superficial (Ta) para a fase com invasão da lâmina própria (T1).
- A metilação do promotor do gene *APC* parece acontecer em tumores a partir do estadio 2.
- Foi possível realizar a detecção de metilação em promotores gênicos através de MSP a partir de DNAs extraídos de amostras de urina. A comparação entre os perfis de metilação obtidos com amostras provenientes de urina e de tumores mostrou uma concordância quase perfeita. Os resultados aqui apresentados indicam que o limite de sensibilidade do método empregado é de 7000 células, ou seja, é preciso que a amostra de urina a ser analisada possua, no mínimo, esta quantidade de células neoplásicas, para que o resultado possa ser positivo.
- Este trabalho descreve a construção de um modelo experimental para estudo de hipermetilação por MSP em um promotor gênico nunca antes analisado. O gene utilizado para confirmar este modelo foi o gene *ADAM23*. Os resultados obtidos mostram que o modelo desenvolvido é viável e a metilação no gene *ADAM23* parece não ser freqüente em câncer de bexiga.
- Embora os resultados obtidos neste estudo indiquem haver uma estreita correlação entre a hipermetilação de regiões promotoras de determinados genes e diferentes aspectos da progressão do câncer de bexiga, um estudo mais amplo, com um maior número de amostras é necessário para demonstrar, de forma irrefutável, que estes achados moleculares podem

ser utilizados como marcadores para o diagnóstico e o acompanhamento de pacientes portadores desta neoplasia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amira N, Mourah S, Rozet F, et al. Non-invasive molecular detection of bladder cancer recurrence. **Int J Cancer** 2002; 103:293-7.

Bachman KE, Herman JG, Corn PG, et al. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. **Cancer Res** 1999; 59:798-802.

Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2727-30.

Cal S, Freije J M, Lopez JM, Takada Y, Lopez-Otin C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol BiolCell** 2000; 11:1457-69.

Chan MW, Chan LW, Tang NL, et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. **Clin Cancer Res** 2002; 8:464.

Costa FF, Salim ACM, Ierardi DF, et al. Aberrant methylation and silencing of the ADAM23 gene in human cancers 2003 (Manuscrito em preparação)

Dominguez G, Carballido J, Silva J, et al. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. **Clin Cancer Res** 2002; 8:980-5.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification of Urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder Bladder Consensus Conference Committee. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:1435-48.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:67-70.

Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. **Cancer Res** 2000a; 60:4366-71.

Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis **Cancer Res** 2000b; 60:2368-71.

Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. **Am J Pathol** 1999; 154:635-47.

Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001;98, 392-4.

Ferguson AT, Evron E, Umbricht C B, et al. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:6049-54.

Flord A, Frankee K, Niederacher D, Gerharz C, Seifer H, Schulz W. DMA methylation and the mechanisms of CDKN2A inactivation in transicional cell carcinoma in the urinary bladder. **Lab Invest** 2000; 80:1513-22.

Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ. Correlation of loss of heterozygosity at 11p with tumour progression and survival in non-small cell lung cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 1994; 10:183-9.

Friedrich M, Erbersdobler A, Schwaibold H, Conrad S, Huland E, Huland H. Detection of loss of heterozygosity in the P53 tumor supressor gene with PCR in the urine of patients with bladder cancer. **J Urol** 2000; 163:1039-42.

Gasco M, Bell AK, Heath V, et al. Epigenetic inactivation of 14-3-3 sigma in oral carcinoma: association with p16(INK4a) silencing and human papillomavirus negativity. **Cancer** 2002a; 62:2072-6.



Gasco M, Sullivan A, Repellin C, et al. Coincident inactivation of 14-3-3sigma and p16INK4a is an early event in vulval squamous neoplasia **Oncogene** 2002b; 21:1876-81.

Gonzalgo ML, Hayashida T, Bender CM, et al. The role of DNA methylation in expression of the p19/p16 locus in human bladder cancer cell lines. **Cancer Res** 1998;58:1245-52.

Habuchi T, Takahashi T, Kakinuma H, et al. Hypermethylation at 9q32-33 tumour suppressor region is age-related in normal urothelium and an early and frequent alteration in bladder cancer. **Oncogene** 2001; 20:531-7.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:9821-6.

Herman J G, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:6870-5.

Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, et al. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2002; 11:445-50.

Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science** 2001; 293:1068-70.

Jones PA, Laird P. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genet** 1999; 21:163-7.

Jung I, Messing E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. **Cancer Control** 2000; 7:325-34.

Koizume S, Tachibana K, Sekiya T, Hirohashi S, Shiraishi M. Heterogeneity in the modification and involvement of chromatin components of the CpG island of the silenced human CDH1 gene in cancer cells. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:4770-80.

Maruyama R, Toyooka S, Toyooka K O, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features **Cancer Res** 2001; 61:8659-63.

Mirra, AP, Latorre, MRDO, Veneziano, DB. **Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil 1997-1998**. Brasília, Ministério da Saúde, 2001.

Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Res** 2000; 60:4346-8.



Orlow I, Lacombe L, Pellicer I, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the histoblood group ABO(H) in primary bladder tumors. **Int J Cancer** 1998; 75:819-24.

Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. **Cancer Res** 2000; 60:5954-8.

Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer **Eur J Hum Genet** 2002; 10:6-16.

Rosas S L, Koch W, Costa Carvalho M G, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients **Cancer Res** 2001; 61:939-42.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene** 2001; 20:3156-65.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:914-21.

Seripa D, Parrela P, Gallucci M et al. Sensitive detection of transicional cell carinoma of the bladder by microsatellite analysis of cells exfoliated in urine. **Int. J. Cancer**. 2001;6:364-9.

Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. **Science** 1997; 278:1054-9.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:210-9.

Singal R; Ginder GD. DNA methylation. **Blood** 1999; 93:4059-70.

Smiraglia DJ, Rush LJ, Frühwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF e col. Excessice CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. **Human Mol Genet**. 2001; 10 (13):1413-9.

Steiner G, Schoenberg MP, Linn JF, Mao L, Sidransky D. Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine. **Nat Med** 1997; 3:621-4.

Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers **Cancer Res** 2000; 60:4353-7.

Tada Y, Wada M, Taguchi K, et al. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. **Cancer Res** 2002; 62:4048-53.

Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, et al. Aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) promoter region in colorectal cancers and adenomas. **Cancer Res** 2002; 62:3382-6.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman J G, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:8681-6.

Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, et al. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. **Oncogene** 2000; 19:3642-6.

Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Res** 2000; 60:1835-9.

Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer **Oncogene** 2001; 20:3348-53.

Vriesema JL, Poucki MH, Kiemeney LA, Witjes JA. Patient opinion of urinary tests versus flexible urethrocystoscopy in follow-up examination for superficial bladder cancer: a utility analysis. **Urology** 2000; 56:793-7.

Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. **Cancer Res** 2001; 61:249-55.