

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES
MOLECULARES PARA O DIAGNÓSTICO E
PROGNÓSTICO DOS CARCINOMAS DE
CÉLULAS TRANSICIONAIS DE BEXIGA**

MARCILEI ELIZA BUIM

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção de grau de
Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Sadek Sarkis

Co-Orientadora: Dra. Maria Aparecida Nagai

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Buim, Marcilei Eliza

**Identificação de biomarcadores moleculares para o diagnóstico e
prognóstico dos carcinomas de células transicionais de bexiga** / Marcilei Eliza
Buim -- São Paulo, 2005.

110 p.

Tese(doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Álvaro Sadek Sarkis

Descritores: 1.CÂNCER DA BEXIGA. 2.PERFIL DA EXPRESSÃO GÊNICA.
3. MARCADORES DE TUMOR/genética.

Toda idéia que fica no ar é, entre nós uma semente que fica na terra. É preciso tempo para que ela brote e chegue a dar flores e frutos.

DEDICATÓRIA

À minha mãe pelo amor e incentivo constante

Ao meu avô Nelson (*In memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Álvaro Sadek Sarkis por ter me orientado e por ter cedido as amostras para esse estudo.

À Dra. Maria Aparecida Nagai por ter me orientado.

À Dra. Maria Mitzi Bretani, chefe da Disciplina de Oncologia do Departamento de Radiologia-FMUSP, por autorizar o desenvolvimento desse trabalho no Laboratório de Genética Molecular do Câncer-LIM 24-FMUSP.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares do Departamento de Anatomia Patológica, que gentilmente analisou e dissecou as amostras.

Ao Carlos Nascimento e Miyuki Silva pela gentileza e competência que cortaram as amostras.

À Ana Maria Kuninari e a Márcia Hiratani por sempre me ajudarem no que foi possível e pela atenção e carinho que tiveram comigo.

À equipe da Biblioteca, Suely Francisco, Rosinéia Carneiro, Francyne Lima e Maria Adriana Bassols pela disposição em me ajudar e pela competência e correções feitas na dissertação.

À Mariana Santos Lopes por ter sido uma companheira de laboratório e fora dele, por sempre estar pronta para me ajudar, pelas opiniões e conselhos que me foram úteis.

À Sibeles Salaorni por ter sido uma grande amiga, pela ajuda na bancada, por ter me transmitido a sua alegria e força, e por ter me ensinado a ter muita fé naquilo que quero.

Às amigas Cláudia M. C. Camilo e Nancy da Rós pela ajuda no laboratório e pelas contribuições nesse trabalho e pelo companheirismo.

À Tatiana Auada e Tatiana Sibov pela amizade, ajuda no laboratório e por terem grande coração.

À Millian e Ana Carolina Marchioli por ter sido companheiras de laboratório, e amigas sempre presentes.

À Simone de Bessa pelas inúmeras vezes que me ajudou no laboratório e pela amizade conquistada.

À querida Dona Antonia e sua filha Bia por tornarem nossa permanência no laboratório mais feliz.

À Elizabethi C. Miracca pelo auxílio no laboratório.

Ao Iran Amorin e Rogério, do Departamento de Urologia do Hospital das Clínicas-FMUSP, pela coleta e organização das amostras.

Aos funcionários Sônia, Yones e Rafles, do Departamento de Urologia, pela ajuda na obtenção dos prontuários.

À Kátia, do Inrad do Hospital das Clínicas, pela ajuda e compreensão todas as vezes que precisei usar o seu computador.

Aos meus tios Ileyni A. C. Peixoto e Floriano Peixoto por estarem sempre presentes e poder contar com eles nas horas alegres e difíceis, ao longo desses anos de doutorado.

A minha mãe, Ivani por ter me financiado sempre que precisei, por ser paciente e compreensiva, e principalmente por me incentivar a fazer pesquisa.

À amiga Edna Barros pelas valiosas conversas e conselhos, pelas inúmeras vezes que me ajudou. Ao Thiago Barros pela ajuda no computador e na formatação das figuras.

À Dra. Otávia Luiza Damas de Caballero, ao Dr. Anuar Mitre e ao Dr. Luis Fernando Lima Reis por terem participado da banca de qualificação durante o desenvolvimento da minha tese, pelas valiosas críticas e contribuições para esse trabalho.

A Banca Julgadora da Dissertação: Dr. Eduardo Moraes Rego Reis, Dr. André Vettore, Dr. Anuar Mitre e Dr. Francisco Paulo da Fonseca pelas críticas e sugestões.

Aos meus amigos Denis, Beto, Márcia, Lígia, Suzi, Marlene, Alessandra e Frank por poder contar com eles quando precisei.

A FAPESP pelo suporte financeiro e pela bolsa de doutorado concedida.

RESUMO

Buim ME. **Identificação de biomarcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico dos carcinomas de células transicionais de bexiga.** São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Em países desenvolvidos, o câncer de bexiga é a segunda mais comum malignidade genitourinária, é a quarta neoplasia mais freqüente em homens e a décima em mulheres nos EUA. De acordo com as estimativas brasileiras, o câncer de bexiga corresponde a 3% de todos os cânceres. O carcinoma de células transicionais (CTT) compreende 90% dos tumores primários de bexiga. A maioria dos CTT é superficial (pTa, pT1 e pTis), cerca de 25% são tumores invasivos (pT2, pT3, pT4). Os tumores superficiais de bexiga podem recorrer em 50 a 80% dos casos depois da ressecção transuretral da bexiga. A progressão do tumor superficial para tumor invasivo ou desenvolvimento de metástase ocorre em 10-20% dos pacientes. O alvo deste estudo foi identificar genes diferencialmente expressos que podem estar associados com o fenótipo superficial e invasivo dos CTT de bexiga. Usando a técnica de DDRT-PCR, comparamos o perfil de expressão do RNAm dos CTT superficiais (pTaGI, pTaGIII e pT1GIII), invasivos (pT2GIII) e tecido normal. Oitenta e dois fragmentos de cDNA foram isolados e clonados. A análise das seqüências dos fragmentos revelou que 65 clones apresentaram similaridade com seqüências conhecidas e 9 não mostraram similaridade com genes conhecidos através do National Center of Biotechnology Information (NCBI). A função bioquímica desses transcritos incluiu, síntese de proteínas, fator de transcrição, reparo de DNA, metabolismo, proteína kinase, resposta ao stress oxidativo e proteínas hipotéticas, entre outras. Entre os genes diferencialmente expressos, os genes *SFRP1*, *CEP63* e *EIF4G2* foram validados por Real Time-PCR. O gene *SFRP1* é um modulador da via de sinalização do Wnt; o gene *CEP63* é uma proteína de centrômero e o *EIF4G2* é um fator de iniciação da tradução em eucariotos. Os genes *CEP63* e *EIF4G2* mostraram alterações no padrão de expressão em CTT comparados com o tecido normal, a expressão reduzida foi observada na maioria dos tumores analisados. O transcrito do gene *SFRP1*

apresentou diminuição da expressão em 90% dos tumores de bexiga analisados por Real Time-PCR. O padrão de metilação do DNA na região promotora do gene *SFRP1* também foi analisado. A hipermetilação foi observada em 23,5% dos tumores de bexiga e foi associada com a progressão dos tumores ($p=0,016$). A maioria dos tumores que mostraram metilação na região promotora de *SFRP1* também mostrou perda de expressão deste gene. Esses dados sugerem que o gene *SFRP1* pode contribuir para a carcinogênese de bexiga e pode ser um gene candidato para prever a progressão do tumor. A metilação na região promotora pode ser um dos eventos que está silenciando o gene de *SFRP1* em tumores de bexiga. Os genes *EIF4G2* e *CEP63* podem estar relacionados a carcinogênese de bexiga, entretanto novos estudos deverão ser realizados, para se determinar o papel desses genes no processo de tumorigênese dos CTT de bexiga.

SUMMARY

Buim ME. [**Identification of the molecular markers for diagnosis and prognosis in transitional cell carcinoma of bladder**]. São Paulo; 2005. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

In developed countries, bladder cancer is the second most common genitourinary malignancy and occupies the 4th and the 10th rank of neoplasm in males and females, respectively. According to Brazilian estimates, bladder cancer correspond to 3% of the new cancer cases. Transitional cell carcinoma (CTT) comprises over 90% of primary bladder tumors. The majority of CTT is superficial (pTa, pT1 and pTis), about 25% are invasive tumor (pT2-pT4). Superficial bladder cancer can recur in 50-80% of the cases after transurethral resection of tumor bladder. Tumor progression to muscle invasive disease or development of metastasis occur in 10-20% of patients. The aim of this study is the identification of differentially expressed genes that might be associated with the superficial and invasive phenotypes of bladder cancer. By using Differential Display–Polymerase Chain Reaction technique (DDRT-PCR), we compared the mRNA expression profiles of superficial tumor (grade I, pTa; grade III, pTa; grade III, pT1), invasive tumor (grade III, pT2) of CTT and normal tissue of bladder. Eighty-two cDNA fragments were isolated and cloned. Sequencing analysis these fragments revealed that 65 clones similarity with known genes and 9 of them showed no homology to ESTs in the National Center of Biotechnology Information (NCBI). The biochemical functions of the transcripts include ribosomal proteins, transcription factors, mismatch repair, metabolic enzymes, protein kinases, response to oxidative stress and hypothetical protein. Among the differentially expressed genes, *SFRP1*, *CEP63* and *EIF4G2* genes were validated by Real Time-PCR. *SFRP1* is a modulator of pathway Wnt signaling; the *CEP63* is a centrosomal protein and *EIF4G2* is an eukaryotic initiation translation factor. Both *CEP63* and *EIF4G2* genes showed altered expression patterns in CTT as compared with the normal bladder tissue, down-regulated these transcripts were found to be in the majority of tumors analyzed. The transcript of the *SFRP1* gene has been shown to be down-regulated in

90% of the bladder tumors analyzed by Real Time-PCR. The pattern of DNA methylation of the promoter region of the *SFRP1* gene was also analysed. Hypermethylation was observed in 23,5% of bladder tumor analyzed and was associated with progression tumor ($p=0.016$). The differentially expressed genes identified in this study may play a role in the tumorigenese process of bladder cancer and might be considere as candidates to predict clinical phenotypic behavior of the disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo do estadiamento dos tumores de bexiga de acordo com o sistema TNM.	7
Figura 2	Cortes histológicos de tecidos congelados e corados com hematoxilina e eosina.	8
Figura 3	Representação esquemática do ensaio de <i>Differential Display</i> .	31
Figura 4	Gel de agarose 1% contendo formaldeído, representativo da análise da qualidade e integridade do RNA extraído de tumor e tecido normal de bexiga.	45
Figura 5	Gel de agarose 1% representativo da análise da qualidade e integridade do DNA extraído de amostras tecido tumoral e normal e bexiga	46
Figura 6	Gel de agarose 2% representativo da análise da contaminação dos <i>pools</i> de RNA por DNA genômico.	49
Figura 7	Autorradiograma representativo das análises da expressão diferencial de genes através da técnica DDRT-PCR.	50
Figura 8	Gel de agarose 2% representativo da reamplificação por PCR.	53
Figura 9	Gel de agarose 1,5% representativo da amplificação de diferentes clones provenientes de dois fragmentos de cDNA extraído dos géis de DDRT-PCR.	54
Figura 10	Eletrofluorograma representativo do seqüenciamento de uma amostra, através do sequenciador automático MegaBace 1000.	55
Figura 11	Autorradiogramas representativos das análises de expressão diferencial dos genes através da técnica de <i>DDRT-PCR</i> .	61
Figura 12	Esquema representativo da análise de uma seqüência que apresentou similaridade com o gene <i>SFRP1</i> através do algoritmo BLAT.	62
Figura 13	Esquema representativo da análise de uma seqüência que apresentou similaridade com o gene <i>CEP63</i> através do algoritmo BLAT.	63

Figura 14 Esquema representativo da análise de uma seqüência que apresentou similaridade com o gene <i>EIF4G2</i> através do algoritmo BLAT.	64
Figura 15 Gel de agarose 2% representativo do ensaio por RT-PCR para a amplificação do gene <i>SFRP1</i> e β_2 - <i>Microglobulina</i> .	66
Figura 16 Gráfico representativo da análise de expressão do gene <i>SFRP1</i> em tecido normal e CTT de bexiga por Real Time-PCR.	68
Figura 17 Gel de agarose 2% representativo das amplificações por PCR com os oligonucleotídeos do gene <i>HIC</i> para verificar a digestão com a enzima <i>HpaII</i> .	71
Figura 18 Gel de agarose 2% representativo da análise de metilação do gene <i>SFRP1</i> em CTT de bexiga.	72
Figura 19 Distribuição da frequência de metilação na região promotora do gene <i>SFRP1</i> em amostras de tecido normal e os carcinomas de células transicionais de bexiga.	74
Figura 20 Gráfico representativo das amostras que apresentaram metilação na região promotora e da análise de expressão do gene <i>SFRP1</i> .	75
Figura 21 Gel de agarose 2% representativo do ensaio por RT-PCR para a amplificação do gene <i>EIF4G2</i> e do gene <i>CEP63</i> , em amostras de tecido de bexiga.	78
Figura 22 Gráfico representativo da análise de expressão do gene <i>EIF4G2</i> em tecido normal e CTT de bexiga por Real Time-PCR.	79
Figura 23 Gráfico representativo da análise de expressão do gene <i>CEP63</i> em tecido normal e CTT de bexiga por Real Time-PCR.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das amostras por pacientes.	22
Tabela 2	Características demográficas dos pacientes e classificação dos carcinomas de células transicionais de bexiga.	22
Tabela 3	Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados.	29
Tabela 4	Resultados dos genes diferencialmente expressos entre o tecido normal e os carcinomas de células transicionais de bexiga.	56
Tabela 5	Associação da metilação do gene <i>SFRP1</i> com os parâmetros clínicos-histopatológicos e demográficos.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Adenomatous poliposi coli
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BRCA1	Breast cancer gene1
BRCA2	Breast cancer gene 2
BLAT	Blast like alignment tool
BLAST	Basic local alignment searching tool
BLCAP	Bladder cancer associated protein
BTA	Antígeno tumoral de bexiga
BTE	Tris-ácido bórico-EDTA
CaCl₂	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CDK4/6	Cyclin-dependent kinase 4/6
CDKN2	Cyclin dependent kinase inhibitor 2 A
c-erbB-2	Epidermal growth factor receptor
CEP63	Centrosome protein 63
C-myb	C myb myeloblastosis viral oncogene homolog
C-myc	C-myc-myelocytomatosis viral oncogene homolog
COX1	Ciclooxigenase 1
COX2	Ciclooxigenase 2
CRD	Domínio rico em cisteína
CT	Threshould cycle
DDRT-PCR	Differential display reverse transcriptase-polimerase chain reaction
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado
E-cad	E-caderina
E.coli	Echerichia coli

EDTA	Etileno tetraacetato
EGFR	Epidermal growth factor
EIF4A	Eukaryotic translation initiation factor 4 A
EIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EIF4G2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma2
EIF4F	Eukaryotic translation initiation factor 4F
eIF3	Eukaryotic translation initiation factor 3
EST	Expressed sequences tags
E2F	E2F transcription factor
E2C/UBCH10	Similar ubiquitin-conjugating enzyme E2C
FEZ1/LZTS1	Fasciculation and elongation protein zeta 1/leucine zipper, putative tumor supressor 1
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FHIT	Fragile histidine triad gene
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
G	Graduação histopatológica
GI	tumore bem diferenciado
GII	Tumor moderadamente diferenciado
GIII	Tumor pouco diferenciado
GADD	Growth arrest and DNA-damage inducible
GAPDH	Glyceraldeyde 3-phosphatase dehydrogenase
GSK3β	Glicogen syntase kinase 3β
H2O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HIC	Hypermethylated in cancer
H-ras	Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IGF	Insuline-like growth factor
IL-8	Interleukin 8
KCl	Cloreto de potássio
KD	Kilodalton

K-ras	Ki-ras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Litro
LEF	Fator de crescimento de linfócitos
L-myc	Lung carcinoma myc related oncogene
LOH	Perda de heterozigose
MCM/BM28	MCM2 minichromosome maintenance deficient
MDM2	Mdm2 transformed 3T3 cell double minute 2
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MLH1	mutL homolog 1
mM	Milimolar
MMP9	Matrix metaloproteinase 9
MSH2	mutS homolog 2
MS-PCR	Methylation Sensitive-Polimerase Chain Reaction
MUC7	Mucin 7
MYCL	v-myc-myelocytomatosis viral oncogene homolog
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NMP22	Matrix nuclear protein 22
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
NEK2	NIMA- regulated kinase 2
ng	Nanogramas
p	Braço curto do cromossômo
P15	Proteína de 15 kilodaltons
P16	Proteína de 16 kilodaltons
pb	Pares de base
PCR	Polimerase chain reaction
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
PMS1	Post meiotic segregation increasead 1

PMS2	Post meiotic segregation increasead 2
q	Braço longo do cromossomo
RAF1	Raf 1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RASSF1A	Ras association (Ral/GDS/AF-6) domain family1
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
rpm	Rotação por minuto
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polimerase Chain Reaction
SAGE	Análise seriada de expressão gênica
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFRP1	Secreted frizzled related protein 1
SPSS	Statistical Package for Social Science
STK15/BTAK	Serine/threonine kinase 15/aurora kinaseA
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-SDS
TCF	Fator de células T
TNM	Tumor node metastase- sistema de classificação clínica
TP53	Tumor protein 53
TP73	Tumor protein 73
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano
U	Unidade
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WNT	Wingless type protein

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Genética do câncer	1
1.2	Câncer de bexiga	3
1.3	Aspectos genéticos do câncer de bexiga	10
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivo específico	19
3	MATERIAL E MÉTODO	20
3.1	Caracterização das amostras e pacientes	20
3.2	Extração de DNA e RNA	23
3.2.1	Extração de DNA	23
3.2.2	Extração de RNA	24
3.2.2.1	Extração de RNA com Fenol-guanidina isotiocianato	24
3.2.2.2	Extração de RNA com o reagente Trizol	26
3.3	Tratamento do RNA com <i>DNase I</i>	26
3.3.1	Síntese de cDNA	27
3.3.2	Teste de contaminação do RNA por DNA	27
3.4	Análise de expressão gênica diferencial por <i>DDRT-PCR</i> (<i>Differential Display Reverse Transcriptase-PCR</i>)	30
3.4.1	Síntese de cDNA	30
3.4.2	Amplificação do cDNA por <i>PCR</i>	32
3.4.3	Recuperação e reamplificação dos fragmentos expressos diferencialmente	33
3.5	Clonagem dos fragmentos reamplificados	34
3.5.1	Amplificação por <i>PCR</i> dos fragmentos clonados	35
3.6	Seqüenciamento do DNA	36
3.7	Análise e anotação das seqüências	37
3.8	Confirmação da expressão diferencial	37

3.8.1	<i>RT-PCR</i>	37
3.8.2	<i>Real Time –PCR</i>	38
3.8.3	Análise de Metilação	39
3.8.3.1	Digestão do DNA com enzimas de restrição	39
3.8.3.2	Controle de massa após a digestão e precipitação	40
3.8.3.3	<i>MS-PCR (Methylation-Sensitive-Polimerase chain reaction)</i>	41
3.9	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Extração de RNA e DNA	43
4.2	Análise da expressão diferencial de genes	47
4.3	Confirmação da expressão diferencial	60
4.4	Validação do gene <i>SFRP1</i>	65
4.4.1	Análise de expressão de <i>SFRP1</i> por <i>RT-PCR</i>	65
4.4.2	Análise da expressão de <i>SFRP1</i> por <i>Real Time-PCR</i>	67
4.4.3	Análise de metilação do gene <i>SFRP1</i>	69
4.4.4	Análise de expressão versus análise de metilação do gene <i>SFRP1</i>	75
4.5	Validação dos genes <i>EIF4G2</i> e <i>CEP63</i>	76
4.5.1	Análise de expressão dos genes <i>EIF4G2 CEP63</i> por <i>Real Time-PCR</i>	76
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÕES	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 GENÉTICA DO CÂNCER

O câncer é uma doença genética associada a múltiplas alterações. O câncer é derivado da progênie de uma célula que sofreu uma alteração genética inicial. As células filhas derivadas desta célula inicial se multiplicam e acumulam uma série de alterações genéticas e epigenéticas que levam a alterações nas atividades dos genes e permitem a instalação do fenótipo tumoral. A maioria desses eventos é composta por alterações em células somáticas, mas em alguns casos os eventos podem ocorrer em células germinativas (CAVENEY e WHITE 1995; JONES e BAYLIN 2002; WEBER 2002).

A integridade e a função de um tecido são conferidas por um equilíbrio estabelecido entre a proliferação e a morte celular. Quando este equilíbrio é perdido, as células passam a se proliferar de forma anômala, formando uma massa desordenada que constitui o tumor primário (SUGIMURA 1998). No processo de progressão tumoral algumas células tumorais perdem a capacidade de adesão, não respondem mais a sinais inibidores de crescimento e passam a replicar-se sem controle. Invadem a membrana basal do tecido de origem, atravessam paredes de vasos, caem na circulação sanguínea ou linfática e formam áreas de proliferação em outros tecidos, caracterizando a metástase (CAVENEY e WHITE 1995; WEINBERG 1996).

Segundo MOHRERNWEISER e JONES (1998), 95% dos casos de tumores são devidos a exposição a carcinógenos e ao estilo de vida do indivíduo e cerca de 5% de todos os cânceres são causados por fatores hereditários.

Basicamente três classes de genes estão envolvidas no processo da carcinogênese: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA (CAVENEY e WHITE 1995; CHO e HEDRICH 1997; SUGIMURA 1998).

Os proto-oncogenes estão envolvidos no controle do ciclo celular, atuando no crescimento e diferenciação celular. Quando alterados principalmente por mutação pontual, translocação cromossômica ou por amplificação gênica, transformam-se em oncogenes. Mutações em oncogenes estão freqüentemente associadas a ganho de função, conduzem a célula à proliferação descontrolada, produzindo um sinal positivo para o desenvolvimento do tumor (VENITT 1994; WHARTENBY et al. 1995). Como exemplos dessa classe temos os genes da família *RAS*, *BCL2* e *RET* (WILLIAMS 1995).

Os genes supressores de tumor são genes que atuam inibindo a proliferação celular. A inativação destes genes está envolvida no processo de tumorigênese. As principais causas da inativação são mutação de ponto, perda do cromossomo inteiro ou parte dele e metilação na região promotora do gene. As mutações nesta classe de genes são recessivas e afetam a função celular quando ambos os alelos forem danificados ou perdidos (WHARTENBY et al. 1995; IRELAND et al. 1997; WEBER et al. 2002; BALMAIN et al. 2003). Os exemplos mais conhecidos desta classe de genes são o *TP53*, encontrado mutado em vários tipos tumorais, o *RB*, o *WT1*, o *BRCA1* e *BRCA2* (WEINBERG 1996).

Os genes de reparo de DNA possuem as funções de assegurar a integridade do genoma e a fidelidade na transferência de informações. As mutações nestes genes ocasionam processos ineficientes de reparo e de replicação do DNA. A ocorrência de genes de reparo de DNA alterados proporciona maior probabilidade de aparecimento de mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Como exemplo dessa classe de genes, temos: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1* e *PMS2* (STRACHAM e READ 1996; CHO e HEDRICH 1997; HUSSAIN e HARRIS 1998).

1.2 CÂNCER DE BEXIGA

O câncer de bexiga é considerado uma questão de saúde pública devido a sua frequência e mortalidade (DROLLER 1998). No mundo, milhões de pessoas são afetadas por alguma forma de câncer no trato urinário. O câncer de bexiga é o segundo em frequência a acometer o trato urinário, superado apenas pelo de próstata. A incidência do câncer de bexiga vem aumentando nos últimos anos nos países desenvolvidos, aproximadamente 335.795 novos casos são diagnosticados mundialmente a cada ano (AMIRA et al. 2002).

O tumor de bexiga representa a quarta neoplasia mais freqüente entre os homens e a décima entre as mulheres nos Estados Unidos (Amira, 2002), sendo que 54 mil casos de câncer de bexiga, aproximadamente, foram diagnosticados em 2001, levando a 12 mil óbitos (WILLIAMS et al. 2001). No Brasil, segundo os dados do INCA (<http://www.inca.com.br>) este tipo de câncer está entre os 10 de maior incidência no país. Aproximadamente 7.550 novos casos de câncer de bexiga foram diagnosticados no ano de 1999, representando 3% de todos os cânceres.

A maior incidência deste câncer ocorre em indivíduos com idade entre 60 e 80 anos. Em jovens, este tumor é raro e na maioria dos casos, os carcinomas superficiais são mais frequentes (GIBAS e GIBAS 1997). O tumor de bexiga é 3 a 4 vezes mais frequente em homens do que em mulheres (WAI e MILLER 2002).

Alguns fatores ambientais parecem ter papel significativo no câncer de bexiga, entre eles destacam-se: o tabagismo, exposição ocupacional a agentes carcinogênicos, a infecção de bexiga e a inflamação crônica associada à sondagem vesical de demora (DROLLER 1998; MEIJDEN 1998; JUNG e MESSING 2000; GAGO-DOMINGUEZ et al. 2001).

O tabagismo é responsável por 50% dos casos de câncer de bexiga, elevando em até quatro vezes o risco de desenvolvimento da doença em relação aos não fumantes. A exposição ocupacional a agentes carcinogênicos, na grande maioria à aminas aromáticas, é responsável por 20% dos casos de câncer de bexiga em homens e 10% em mulheres. Tem sido relatado que os indivíduos que trabalham em fábricas de corantes, borracha, alumínio, na indústria química e na aplicação de pesticidas têm maior risco de desenvolver tumor de bexiga. Além disso, a irradiação pélvica e a exposição à droga ciclofosfamida também parecem ser importantes fatores de risco no desenvolvimento da doença (JUNG e MESSING 2000). A infecção pelo parasita *Schistosoma haematobium* também pode contribuir para a etiologia de tumores de bexiga (SHAW et al. 1999; SHEWEITA et al. 2001). Existem alguns fatores candidatos, que apesar de não estarem bem estabelecidos, parecem ter relação com o aparecimento desse tipo de câncer, são eles: alto consumo de cafeína e adoçantes sintéticos e consumo crônico de álcool. Não existe relato de hereditariedade em câncer de bexiga como ocorre em outros tumores.

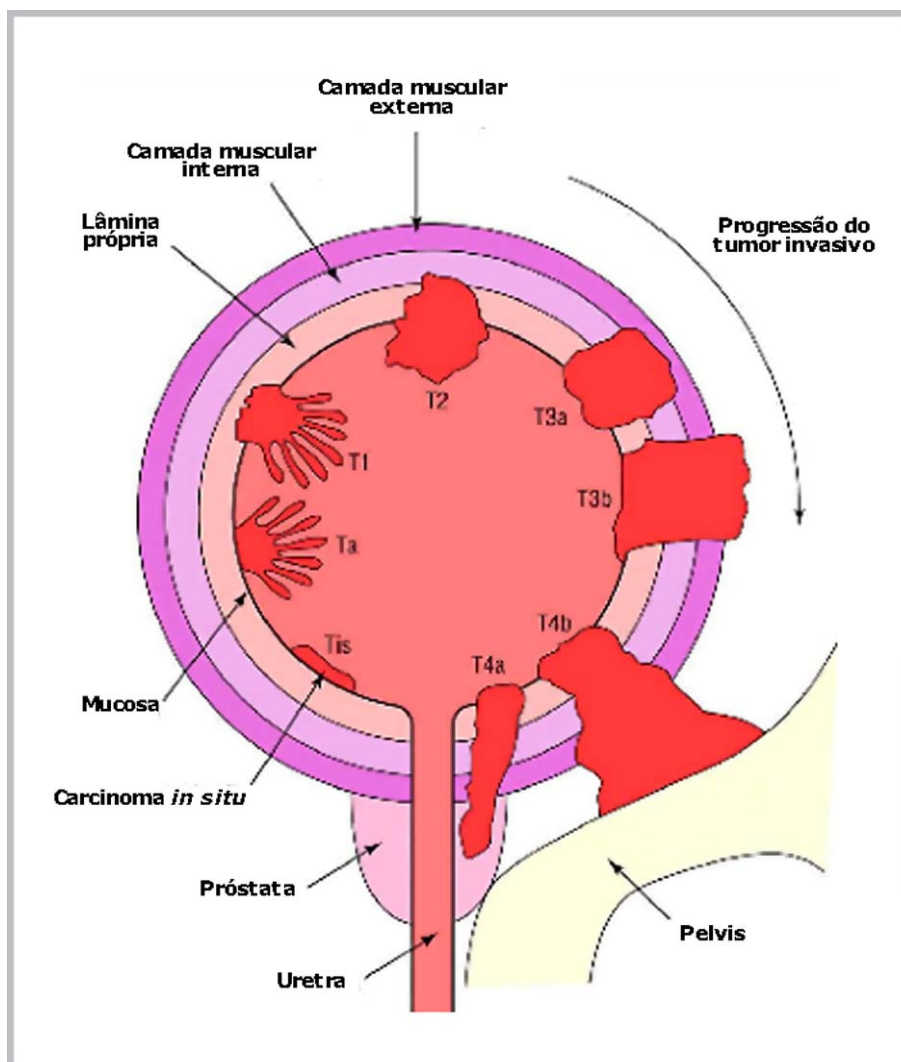
A maioria dos tumores de bexiga (90%) é do tipo carcinoma de células transicionais (CTT). O restante se divide em adenocarcinoma e carcinoma epidermóide (PAN e KOENEMAN 1999; SHAW et al. 1999, VRIESEMA et al. 2001). No câncer de bexiga proveniente da infecção parasitária pelo *S. haematobium* predomina o tipo carcinoma epidermóide e ocorre mais frequentemente em países orientais, onde a esquistosomose é endêmica (SHAW et al. 1999; HAITEL et al. 2001).

Os carcinomas de células transicionais podem ser classificados em 3 formas distintas: carcinoma *in situ*, carcinoma superficial e carcinoma invasivo. O carcinoma *in situ* representa lesão plana intra-epitelial. O carcinoma superficial, que corresponde à cerca de 80% dos casos, é representado por papilas, em geral multifocais, com células mais diferenciadas e sua proliferação se restringe à camada mucosa ou lâmina própria. As classificações patológicas dos tumores de bexiga são, pTa (tumores que proliferam a partir do urotélio) e pT1 (tumores que invadem a lâmina própria). Os tumores superficiais apresentam altas taxas de recidivas locais, em torno de 50 a 80% dos pacientes, e podem progredir para invasivos em cerca de 10 a 25% dos casos, principalmente os tumores que apresentam alto grau histológico (GIII). Já em tumores com baixo grau histológico (GI e GII) a progressão para tumores invasivos é muito baixa (KEEGAN et al. 1998; KNOBLOCH et al. 2000; KONETY et al. 2000).

O carcinoma invasivo manifesta-se quase sempre sob forma nodular, único e de base larga. Histologicamente suas células são menos diferenciadas e infiltram a parede vesical profundamente, atingindo a camada muscular, tecido adiposo, órgãos ou estruturas adjacentes; são estadiados como pT2, pT3 e pT4. Os tumores invasivos

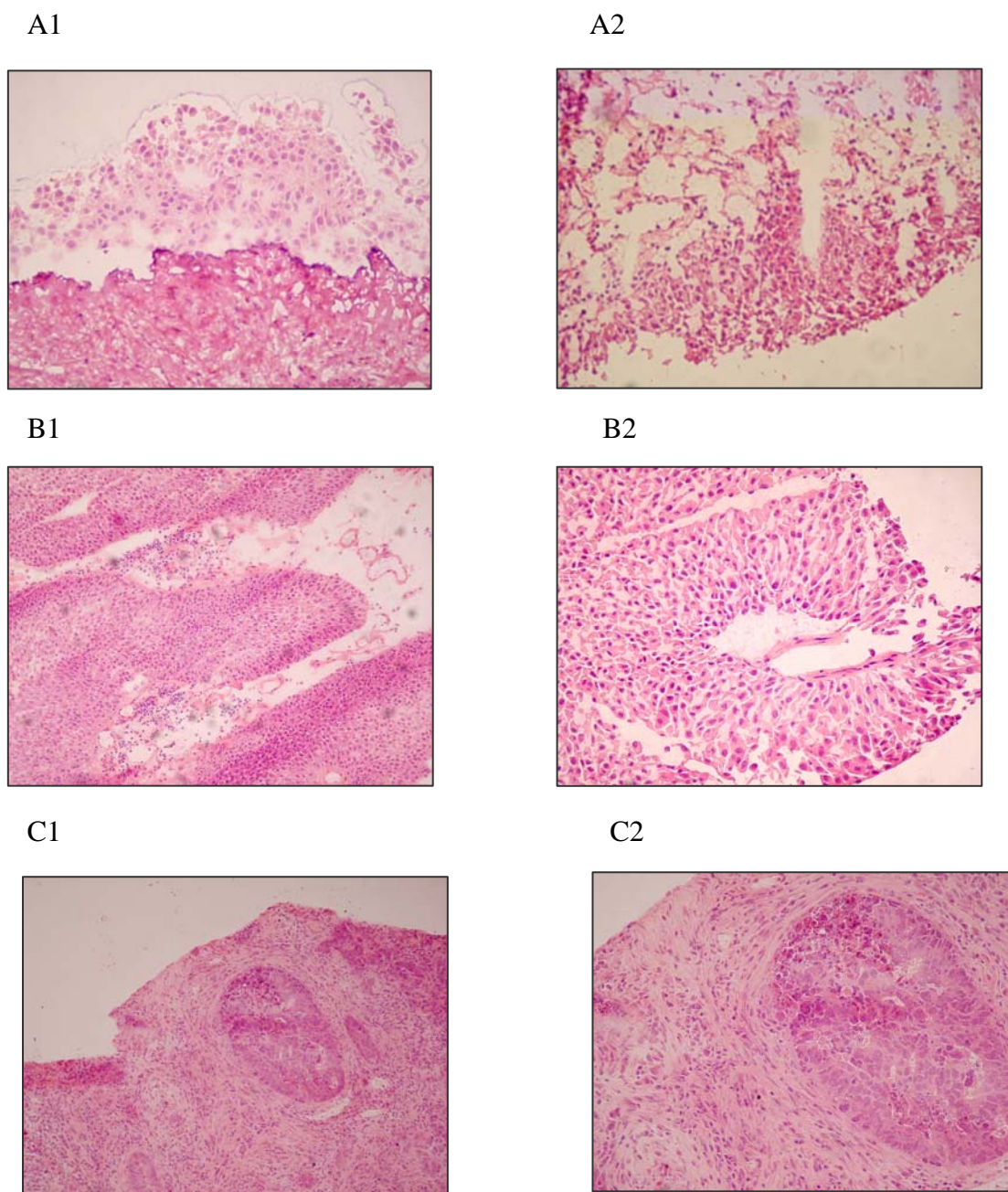
caracterizam-se pela agressividade biológica e têm grande potencial metastático, preferencialmente em fígado, pulmão, ossos e cérebro. Mais de 50% dos pacientes que desenvolvem os tumores invasivos apresentam metástase em 2 anos (HALACHMI et al. 1998; MEIJDEN 1998, STEIN et al. 1998; PRIMDAHL et al. 2000; VRIESEMA et al. 2001). A Figura 1 mostra um desenho esquemático do estadiamento do tumor de bexiga de acordo com o sistema TNM.

Cortes histológicos representativos de amostras de tecido normal, tumor superficial e tumor invasivo estão apresentados na Figura 2.



Fonte: modificado de MEIJDEN (1998)

Figura 1- Esquema representativo do estadiamento dos tumores de bexiga de acordo com o sistema TNM.



Legenda: A, tecido normal de bexiga; B, tumor superficial; C, tumor invasivo. A1, B1 e C1 aumento original de 100x; A2, B2 e C2 aumento original de 200x

Figura 2 - Cortes histológicos de tecidos congelados e corados com hematoxilina e eosina.

Os testes de detecção mais eficazes feitos atualmente são a citoscopia e a biópsia, mas esses procedimentos são invasivos, de alto custo e causam desconforto para o paciente, o que dificulta o seu acompanhamento. Estas técnicas têm mostrado baixa especificidade e baixa sensibilidade, só sendo possível a detecção com maior precisão em tumores com alto grau de malignidade. A citologia urinária também é utilizada, mas apresenta baixa sensibilidade e pouca reprodutibilidade (DROLLER 1998; MEIJDEN 1998).

Alguns marcadores moleculares no soro e na urina também estão sendo utilizados para ajudar no diagnóstico, eles incluem: antígeno tumoral de bexiga (BTA), proteína nuclear de matrix (NMP22), telomerase, ácido hialurônico entre outros (SÁNCHEZ-CARBAYO 2003).

O CTT de bexiga é altamente heterogêneo histologicamente, tornando difícil o seu prognóstico. As técnicas convencionais são incapazes de prever com segurança o comportamento da maioria dos tumores de bexiga. Atualmente não é possível distinguir os indivíduos cujo câncer de bexiga não irá progredir daqueles em que o câncer será potencialmente letal, principalmente entre os portadores de carcinoma superficial de bexiga. A detecção precoce da doença poderia melhorar a sobrevivência dos pacientes, portanto, a pesquisa de novos testes para a detecção subclínica do câncer de bexiga de maneira mais eficiente e menos invasiva é objeto de interesse em pesquisa que poderá influenciar diretamente no tratamento destes pacientes (GROSSFELD et al. 1999; JUNG e MESSING 2000; TIGUERT et al. 2002).

1.3 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER DE BEXIGA

Várias alterações genéticas estão envolvidas na carcinogênese da bexiga. Estudos citogenéticos e moleculares têm demonstrado que a ativações de vários oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor estão envolvidos no desenvolvimento de tumores de bexiga.

O aumento da expressão do proto-oncogene *C-myc* tem sido observado no núcleo de células tumorais de bexiga (KONTOGEORGOS e ANINOS 1998; STEIN et al. 1998; KOO et al. 1999). O gene *C-myc* está localizado na região cromossômica 8q24 e codifica uma fosfoproteína nuclear que atua como fator de transcrição e participa dos processos de proliferação, apoptose e diferenciação celular (BLACKWOOD e EISENMAN 1991; GREEN 1997). SARDI et al. (1998) demonstraram que o gene *C-myc* está amplificado em 33% dos casos e verificaram que as mutações neste gene são encontradas em diferentes graus e estádios patológicos.

Foram observadas mutações em alguns genes da família *RAS*, como o *K-RAS* e *H-RAS* em tumor de bexiga (ORNTOFT e WOLF 1998), principalmente em carcinomas superficiais (STEIN et al. 1998). Mutações nos códons 12, 13 e 61 (dos genes da família *RAS*) foram encontradas em torno de 20% dos casos de tumor de bexiga (GIBAS e GIBAS 1997; STEIN et al. 1998) e foi mostrada alta frequência da expressão da proteína p21 (produto do gene *RAS*) neste tipo tumoral (KONTOGEORGOS e ANINOS 1998).

Alguns estudos relataram que a expressão alterada do proto-oncogene *C-erbB-2* e de sua proteína estão associadas com o tumor de bexiga de alto grau (ADSHEAD et al. 1998; KONTOGEORGOS e ANINOS 1998).

Outro oncogene associado ao tumor de bexiga é o *BCL-2*, que pertence a uma família de genes que promove a sobrevivência das células inibindo a apoptose (HOCKENBERY et al. 1990). LI et al. (1998) encontraram aumento da expressão da proteína bcl-2 em 50% dos CTT de bexiga. Os tumores de bexiga com alto grau mostraram maior expressão desse gene quando comparados com os cânceres com baixo grau.

O gene supressor de tumor *TP53* está localizado na região do cromossomo 17p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear chamada p53 (LANE e CROWFORD 1979; CHANG et al. 1993). A proteína p53 atua como fator de transcrição para os genes *MDM-2*, *BAX*, *WAF-1*, *GADD*, *IGF* entre outros, regulando o ciclo celular e induzindo a apoptose (IRELAND et al. 1997; HIGASHIYAMA et al. 1998). Aproximadamente 50% dos tumores de bexiga apresentam alta expressão da proteína p53 ou perda de heterozigose no gene *TP53* (LIANES et al. 1994; SARKIS et al. 1994; LI et al. 1998; GROSSFELD et al. 1999; PAN E KOENEMAN, 1999) principalmente em tumores com alto grau (ORNTOFT E WOLF, 1998). Pesquisa realizada por VRIESEMA et al. (2001) mostraram que pacientes com tumores de bexiga superficiais e invasivos apresentaram mutação pontual no gene *TP53*. REIHER et al. (2002) observaram uma forte associação entre a proteína p53 mutada e tumores superficiais de bexiga.

Alguns estudos têm relatado o aumento da expressão da proteína mdm-2 em 20% a 30% dos casos de câncer de bexiga, sugerindo que este gene esteja envolvido na tumorigênese (LIANES et al. 1994; STEIN et al. 1998).

O gene supressor de tumor *RB* (retinoblastoma) atua inibindo a progressão do ciclo celular entre as fases G1 e S (GROSSFELD et al. 1999). Muitos estudos têm mostrado expressão alterada do gene *RB* em tumor de bexiga, o que pode estar associada às propriedades invasivas e ao alto grau (KONTOGEORGOS e ANINOS 1998; ORNTOFT e WOLF 1998).

Alguns estudos sugerem que os pacientes com tumor de bexiga que apresentam alterações no *TP53* e no *RB* têm piores prognósticos do que os pacientes que não possuem estas alterações ou apresentam apenas um dos genes alterados (GROSSFELD et al. 1999).

Outros genes supressores de tumor que apresentam-se mutados em câncer de bexiga são a *E-caderina* (*E-cad*) e *β -catenina* (LIEBERT et al. 1999; GARCIA DEL MURO et al. 2000). O gene *E-cad* está localizado na região cromossômica 16q22-24 e codifica uma proteína transmembrânica que atua no reconhecimento e adesão célula-célula (KEMLER et al. 1993). A invasão das células cancerosas para os tecidos adjacentes pode ser favorecida pela redução da *E-cad*. Diversos estudos têm revelado uma associação entre a diminuição da expressão de *E-cad* e o aumento do grau e estadiamento patológico.

Várias alterações cromossômicas, tanto estruturais quanto numéricas, foram observadas em carcinoma de bexiga. A perda de heterozigose (LOH) foi identificada em muitas regiões cromossômicas indicando que vários genes supressores de tumor, ainda não clonados, podem estar associados ao processo de tumorigênese de bexiga.

NEUHAUS et al. (1999) analisaram os cromossomos Y, 1 e 17 em tumores de bexiga e detectaram uma forte associação entre a polissomia dos cromossomos 1 (46%) e 17 (40%), sendo estas mais freqüentes em tumores superficialmente invasivos do que em superficiais. A perda do cromossomo Y não foi associada a este tipo tumoral por estes autores. Entretanto, GIBAS e GIBAS (1997) relataram a perda do cromossomo Y em tumor de bexiga.

Diversos pesquisadores relataram que aberrações no cromossomo 3 ocorrem em aproximadamente 30% dos tumores de bexiga (GIBAS e GIBAS 1997; KNOBLOCH et al. 2000). No braço curto do cromossomo 3 foi detectada a perda de heterozigose em três regiões 3p12-14, 3p21-24 e 3p24-26, sugerindo que estas regiões podem ter sítio de localização de genes importantes para o desenvolvimento do CTT, como o *FHIT* (BAFFA et al. 2000). O gene supressor de tumor, *FHIT* foi localizado na região cromossômica 3p14.2, que corresponde a uma das regiões mais freqüentemente deletada em CTT de bexiga. BAFFA et al. (2000) detectaram a expressão alterada do gene *FHIT* em linhagem de células e em tumores de bexiga.

A perda da heterozigose em diferentes regiões do cromossomo 9 tem sido observada em CTT de bexiga (ORNTOFT e WOLF 1998). Segundo HORNIGOLD et al. (1999) e HARTMANN et al. (1999) as deleções envolvendo o cromossomo 9 ocorre em mais de 50% dos tumores de bexiga. Quatro regiões deletadas no cromossomo 9 foram previamente definidas em câncer de bexiga, 9p21, 9q12-31, 9q32-33 e 9q34. O gene supressor de tumor *p16*, que foi identificado na região cromossômica 9p21, codifica uma proteína de 16 kD que atua como inibidora de quinase dependente de ciclina 4/6 (*CDK4/6*). A proteína p16 se liga as CDKs inibindo sua associação com a ciclina D1, isto faz com que impeça a fosforilação do

produto do gene *RB* e conseqüentemente iniba a liberação do *E2F*, resultando em inibição da progressão G1-S do ciclo celular (SERRANO et al. 1993). A proteína p16 é freqüentemente alterada em células de câncer da bexiga (GIBAS e GIBAS 1997; ADSHEAD et al. 1998).

Alterações no cromossomo 11 têm sido observadas em câncer de bexiga. A mudança mais comum é a deleção da região 11p em tumores invasivos. Aproximadamente 40% dos tumores invasivos apresentam LOH de 11p (GIBAS e GIBAS 1997; ADSHEAD et al. 1998).

O trabalho realizado por HÖGLUND et al. (2001) indicou a presença de dois caminhos de alterações citogenéticas em tumores de bexiga, o primeiro foi caracterizado pela perda do cromossomo 9 seguido pela perda do braço curto do cromossomo 11, ganho no braço longo do cromossomo 1 e perda do braço curto do cromossomo 17. Essas alterações foram correlacionadas com tumores de estadiamento pTa- pT2. O segundo caminho inicia-se pela perda do cromossomo 7 seguido pela deleção do braço curto e amplificação do braço longo do cromossomo 8 e estão relacionadas a tumores pT1- pT3.

Vários pesquisadores têm investigado a expressão dos genes relacionados a progressão do câncer de bexiga para caracterizar o padrão de expressão gênica diferencial em tumores superficiais e invasivos de células transicionais. IZAWA et al. (2001), detectaram pela técnica de hibridização *in situ*, maior expressão dos genes *VEGF* (fator de crescimento endotelial vascular), *FGF* (fator de crescimento de fibroblasto), *IL-8* (interleucina) e *MMP-9* (matrix metaloproteinase) em tumores invasivos quando comparados com os superficiais e maior expressão de *VEGF* em tumores invasivos quando comparados com carcinoma *in situ* (CIS). Por sua vez, os

carcinomas *in situ* apresentaram maior expressão dos genes *FGF*, *IL-8* e *EGFR* quando comparados com os tumores superficiais sugerindo que o padrão de expressão destes genes está associado ao desenvolvimento da tumorigênese do CTT de bexiga.

PRIMDAHL et al. (2000) detectaram deleções alélicas em genes envolvidos na regulação do ciclo celular em pacientes com câncer de bexiga. Os autores encontraram alta frequência de deleções em tumores com alto estadió versus baixo estadió. Os genes com maiores frequências de deleções foram os *TP53*, *RBI*, *MYCL* e *CDKN2*, todos em tumores invasivos. A combinação das perdas alélicas de *TP53* e *RBI* estava presente em tumores invasivos, mas não foram encontradas nos superficiais.

KONETY et al. (2000) encontraram a proteína bcl-4 expressa em tecido tumoral e normal de pacientes com tumor de bexiga, mas não encontraram a expressão da proteína bcl-4 em tecido de bexiga de indivíduos sem a doença. A expressão desta proteína não foi encontrada em outros tecidos ou tipos tumorais, sugerindo que a proteína bcl-4 pode ser um marcador específico para câncer de bexiga podendo ser usado no diagnóstico da doença.

A expressão do gene *MUC-7* foi identificada em CTT invasivos e em linhagem de células de câncer de bexiga, mas a sua expressão não foi encontrada em tecido normal e em tumor superficial, sugerindo uma expressão diferencial do gene *MUC-7* na transformação maligna do urotélio de bexiga (RETZ et al. 1998). Estudo recente de RETZ et al. (2003) demonstraram que o gene *MUC-7* pode ser um marcador tumoral em potencial para tumor de bexiga. A expressão deste gene foi encontrada em 42% dos tumores pTa, 81% em carcinoma *in situ* e tumores invasivos.

YANO et al. (2002) avaliaram o papel do inibidor de metaloproteinase em tumor de bexiga. As metaloproteinases são enzimas catabólicas da matrix extracelular e têm papel crítico na invasão e metástase. Os autores observaram que o nível de expressão do inibidor de metaloproteinase foi maior em tumores invasivos do que em câncer superficial, sugerindo que a inibição da metaloproteinase está relacionada com a invasão de câncer urotelial. O mesmo resultado foi encontrado por XU et al. (2002) sugerindo que alguns genes da família da metaloproteinase podem ter importante valor prognóstico no CTT de bexiga.

THYKJAER et al. (2001), monitoraram através da técnica de *cDNA Microarray* eventos associados à transformação do epitélio urotelial normal em tumoral. Demonstraram que o tumor superficial pT1 é mais similar ao tumor invasivo pT2 do que ao superficial pTa. Pelo agrupamento dos genes com padrão similar de expressão foram identificados vários genes relacionados com a mesma via biológica. Os autores sugeriram que os tumores superficiais apresentaram alto nível de síntese de proteína, tendo um aumento de genes relacionados a transcrição, e de genes ribossomais, assim como super regulação de proteinases que degradam o tecido. Em tumores invasivos, houve aumento nos transcritos relacionados ao ciclo celular, como *Ciclina A e E*, *C-myb* (que induz *Ciclina A*), fator de crescimento de hepatócitos *MCM/BM28*, genes relacionados ao fuso mitótico (*TTK*) e a separação das cromátide irmãs (*E2-C/UBCH10*) e também *PCTAIRE* (membro da família de *CDK*). No grupo de genes relacionados a adesão celular, foi observado baixa regulação em tumores invasivos, como lamininas, integrinas, receptor de laminina, E-caderina, epicam, fator H e mucina *MGC-24*.

GROMOVA et al. (2002) compararam o perfil de expressão de mRNA em tumores não invasivos (pTaGII) com os invasivos (pT2GIII e pT4) através da técnica de *Differential Display*. Isolaram um gene, o *BC10* (atual *BLCAP*) que foi exclusivamente expresso em tumores superficiais. A expressão deste gene foi confirmada por *RT-PCR* em 30 amostras de pTaGII e GIII, pT2 e pT4. Este gene codifica uma proteína ainda não caracterizada. A baixa expressão deste gene em tumores invasivos sugere um papel importante na progressão do tumor de bexiga.

WHEELER et al. (2002) estudaram a prostaglandina E2 e a proteína de cox-1 e cox-2 (ciclooxigenase) em pacientes com infecção urinária, câncer urogenital, incluindo tumor de bexiga e compararam com indivíduos controles. A prostaglandina contribui para manter o tonus muscular e o processo de eliminação da urina, e o gene *COX* é um precursor da prostaglandina. Observaram aumento da prostaglandina e de *COX-2* em câncer urogenital, infecção urinária e processos inflamatórios. SWEENEY et al. (2002) também detectaram maior expressão da proteína COX-2 em CTT de bexiga do que em tecido normal, sugerindo que COX-2 pode estar envolvido ao início das mudanças celulares levando ao desenvolvimento do câncer.

DYRSKJOT et al. (2003) usaram a técnica de *cDNA Microarray* para analisar a expressão gênica em 40 tumores (pTa, pT1 e pT2) e 4 amostras de tecido normal. Identificaram 1767 genes que foram expressos em diferentes níveis. Através do agrupamento dos genes, identificaram vários perfis de expressão diferencial entre os grupos tumorais. Em tumores pTaGIII foi observado a expressão de genes relacionados a fator de transcrição. Em tumores pTaGIII e carcinoma *in situ* e pT2, apresentaram super regulação de genes relacionados ao controle de ciclo celular e

mitose. Genes relacionados a angiogênese foram super regulados em tumor pT2 e em pTaGIII e no carcinoma *in situ*.

Com o desenvolvimento de metodologias que podem ser utilizadas para a avaliação das diferenças de expressão gênica entre duas ou mais populações celulares, como a Análise Seriada da Expressão Gênica (*SAGE*), *Differential Display*, *Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR)* e *cDNA Microarray*, foram adicionadas importantes ferramentas na lista das técnicas disponíveis para a identificação de genes relacionados ao processo de tumorigênese (LIANG e PARDEE 1992; VELCULESCU et al. 1995).

A utilização da metodologia de *DDRT-PCR* permite a identificação de genes novos e desconhecidos, é uma técnica facilmente executável em qualquer laboratório, relativamente barata comparada com outras, usa pequenas quantidades de RNA e pode-se comparar várias populações de RNA ao mesmo tempo.

Várias alterações genéticas já foram identificadas na carcinogênese de bexiga, entretanto, elas ainda não são utilizadas na identificação desses tumores. Atualmente os parâmetros clínicos-patológicos, são usados na classificação do câncer de bexiga, mas eles nos fornecem poucas informações na determinação de um diagnóstico preciso e na identificação do comportamento clínico do tumor. A identificação de marcadores moleculares para a determinação do prognóstico dos pacientes e na classificação dos tumores é de grande importância. A caracterização de grupos de riscos e a detecção precoce da doença poderiam melhorar a sobrevivência dos pacientes que sofrem de câncer de bexiga, e também permitiria a escolha de terapias mais adequadas e eficazes para cada paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar genes diferencialmente expressos em carcinomas de células transicionais de bexiga superficiais e invasivos, identificar possíveis marcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico da doença.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar o padrão de expressão gênica em tumores superficiais (pTa e pT1) com os tumores invasivos (pT2) e com o tecido normal através da técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase-PCR*.

Validação de genes diferencialmente expressos por *Real Time-PCR*

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS E PACIENTES

Foram coletadas 148 amostras de tecido de bexiga, sendo que 109 eram de carcinoma de células transicionais de bexiga e 39 de tecido normal, provenientes de 96 pacientes portadores de CTT. As amostras foram obtidas no Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas-FMUSP. As amostras foram coletadas antes da realização de qualquer tratamento e foram obtidas através de biopsia, ressecção transuretral, cistectomia e cistoprostatectomia.

Das 148 amostras coletadas, 110 foram processadas para a extração do DNA e do RNA. Entre os tecidos processados obtivemos 88 amostras de DNA e 63 de RNA de boa qualidade e as amostras que apresentaram evidências de degradação foram eliminadas deste estudo para evitar falsos resultados. Dessa forma, para a realização deste estudo foram utilizadas 88 amostras de tecido de bexiga (20 amostras de tecido normal e 68 amostras de tumores), que foram provenientes de 68 pacientes portadores de câncer de bexiga. Alguns pacientes foram submetidos a mais de uma cirurgia, nestes casos obtivemos mais de uma amostra por paciente. A distribuição das amostras por pacientes está apresentada na Tabela 1. Todos os casos foram classificados segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde. Os tumores foram classificados de acordo com os critérios TNM (T- tumor primário; N linfonodos regionais; M- metástase à distância). Após a realização da classificação, as 68 amostras de tecido tumoral foram distribuídas em: 25 amostras de tumores

classificadas como pTaGI; 12 amostras classificadas como pTaGIII; 13 amostras de tumores pT1GIII e 18 amostras de tumores pT2/pT4GIII.

Os dados sobre os pacientes, tais como, idade, sexo, grau histológico e estadiamento clínico dos tumores foram obtidos através de consultas aos prontuários do Hospital das Clínicas-FMUSP. Resumos das características demográficas e dados sobre o estadiamento e grau histológico estão apresentados na Tabela 2.

A média da idade dos pacientes na ocasião do diagnóstico foi de 64 anos (variando de 37 a 87 anos). Todos os pacientes assinaram consentimento aprovado pelo Comitê Ético do Hospital das Clínicas-FMUSP.

As amostras foram estocadas em nitrogênio líquido até o momento de serem utilizadas. De todas as amostras foram feitas lâminas através de cortes histológicos em micrótomo de congelação, coradas com hematoxilina–eosina e analisadas pelo patologista (Dr. Fernando Augusto Soares - Hospital do Câncer) para a confirmação da presença do tecido normal e tumoral, a fim de selecionar as áreas para a extração de RNA e DNA, desse modo tivemos a certeza de estarmos trabalhando com tecido normal e tumoral.

Tabela 1 - Distribuição das amostras por pacientes.

Nº de pacientes	Nº de amostras tumorais	Nº de amostras de tecido normal	Total de amostras
45	45	0	45
7	0	7	7
9	9	9	18
4	8	0	8
2	4	2	6
1	2	2	4
Total 68	68	20	88

Tabela 2 - Características demográficas dos pacientes e classificação dos carcinomas de células transicionais de bexiga.

Variável	Frequência n° (%)
Sexo:	
Masculino	51 (75)
Feminino	17 (25)
Idade:	
≥60 anos	48 (70.5)
< 60 anos	20 (29.5)
Graduação histopatológica	
Baixo grau	25 (37)
Alto grau	43 (63)
Classificação patológica	
Superficial:	
pTa	37 (42)
pT1-	13 (14,7)
Invasivo:	
pT2/T4	18 (20.5)
Tecido normal	20 (22.7)

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

Os tecidos foram retirados do nitrogênio líquido e imediatamente pulverizados com o auxílio de um pulverizador *Termovac* sob nitrogênio líquido e gelo seco. Após a pulverização o material foi dividido em duas partes iguais, uma para a extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio e a outra para a extração de RNA pelo método de fenol-guanidina, através do método CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987) ou com o reagente Trizol.

3.2.1 Extração de DNA

Após a pulverização o material foi colocado em 2mL de TES (Tris-HCL 10 mM, PH 7,6, EDTA 1mM e SDS 0,6%), adicionou-se proteinase K na concentração final de 100ug/mL e incubou-se por 14 a 16 h a 37°C.

Após este período de incubação, o DNA foi extraído com igual volume de fenol saturado com 20mM de Tris-HCL, pH 8,0. Agitou-se por 5 min e em seguida foi adicionado igual volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O material foi então agitado por 5 min e centrifugado por 10 min a 10.000 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado a ele igual volume de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O material foi agitado novamente e centrifugado por 5 min a 10.000 rpm a 4°C.

O DNA que estava contido no sobrenadante foi precipitado com 2,5 volumes de etanol absoluto por 14 a 16h a -20°C. Centrifugou-se por 10 min a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com etanol 75%. O

precipitado final foi seco e diluído em um volume apropriado de TE (Tris- HCL 10mM, pH 7,6, EDTA 1mM).

A concentração do DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda 260/280nm.

Para verificar a integridade da amostra de DNA, 1uL da amostra foi diluído em 3uL tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética as amostras de DNAs foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado.

3.2.2 Extração de RNA

3.2.2.1 Extração de RNA com Fenol-guanidina isotiocianato

O método de extração de RNA descrito por CHOMCZINSKI e SACCHI (1987) se baseia na denaturação de ribonucleases endógenas e lise celular através da solução de denaturação (solução D), precipitação de proteínas e do DNA com acetato de sódio, fenol-clorofórmio e álcool isoamílico e precipitação do RNA com álcool isopropílico.

Após a pulverização o material foi colocado em um tubo contendo 2mL de solução D (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM, pH-7,0, sarcosil 0,5% e β-mercaptoetanol 0,1M) e homogenizado vigorosamente por 10 seg.

Adicionou-se acetato de sódio a 0,2 mM, pH-4,0; 1 volume de fenol saturado com Tris-HCl, pH-5,0 -6,0; e 0,2 volumes de clorofórmio-álcool isoamílico (49:1). A

suspensão final foi homogenizada vigorosamente por 10 seg e incubada em gelo por 15 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 10.000 rpm a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com igual volume de isopropanol por 1 hora a -20°C. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 min a 4°C e o precipitado resultante foi dissolvido em 0,3 mL de solução D e 0,3 mL de isopropanol e incubado por um período de 16 a 18h a -20°C. Depois da incubação a solução foi transferida para um tubo de micro centrifuga e centrifugado por 20 min a 10.000 rpm a 4°C, o precipitado resultante foi lavado com etanol 75% e novamente centrifugado por 10 min a 10.000 rpm a 4°C. A amostra foi seca e dissolvida em água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração do RNA extraído foi determinada por leitura espectrofotométrica com comprimento de onda 260/280nm.

Para verificar a integridade do RNA, 1µL de amostra foi dissolvido em 4µL de água e 3µL de tampão denaturante (7% de glicerol, 10% MOPS 10X, 53% de formamida deionizada, 17% de formaldeído, 6% de azul de bromofenol e 0,25µg/mL de brometo de etídeo) incubado por 15 min a 65°C e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo tampão MOPS 1X (0,2 M de MOPS, 0,4 M de EDTA e 3 M de acetato de sódio) e formaldeído a 37%. A corrida foi feita em tampão MOPS 1X a 40 volts. Após a separação eletroforética as amostras de RNA foram visualizadas em transiluminador com Ultra Violeta e o gel foi fotografado.

3.2.2.2 Extração de RNA com o reagente Trizol

Após a pulverização do tecido em nitrogênio líquido no Termovac, aproximadamente 50–100 mg de tecido foi transferido para um tubo contendo 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen, USA). A solução foi homogenizada e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Depois do período de incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, homogenizado e incubado por 3 min a temperatura ambiente e posteriormente centrifugado por 15 min a 4°C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e transferido para um outro tubo e adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico e homogenizado por inversão. A solução foi incubada por 10 min a temperatura ambiente, centrifugada por 10 min a 4°C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado preservando-se o precipitado que foi lavado em etanol 75% e centrifugado por 5 min a 7.500 rpm. Depois da precipitação o RNA foi seco em centrífuga a vácuo e diluído com água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração do RNA e a sua integridade foram verificadas como descrita no item anterior.

3.3 TRATAMENTO DO RNA COM *DNase I*

As amostras de RNA foram tratadas com enzima *DNase I* para a eliminação do DNA contaminante. O RNA foi incubado em solução contendo 40mM de Tris-HCl, pH 7,5, 6mM de MgCl₂ e 0,25 unidade (U) de *DNase I*/μg de RNA (Amershan Pharmacia Biotech) a 37°C por 1 h. Após o período de incubação as amostras foram precipitadas por um período de 14 a 16 h a -20°C em solução de acetato de sódio 0,2M e 2,5 volumes de etanol absoluto, e a seguir centrifugadas por 15 min a 10.000

rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com etanol 75% e centrifugado por 15 min a 10.000 rpm a 4°C. O precipitado foi seco e diluído em H₂O/ tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e estocado a -70°C.

3.3.1 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita utilizando-se 10 µg de cada amostra de RNA e o *kit High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystem) de acordo com o protocolo do fabricante e 1U/µL de *RNase OUT* (Invitrogen).

3.3.2 Teste de contaminação do RNA por DNA

Para se confirmar a ausência de DNA nas amostras de RNA tratadas com *DNaseI*, estas foram submetidas a ensaio de síntese de cDNA conforme descrito no item anterior. Os produtos obtidos foram submetidos a ensaio de PCR utilizando-se oligonucleotídeos para amplificação do gene *TP53*. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 3. Estes oligonucleotídeos amplificam região que abrangem introm do gene *TP53*. O ensaio foi feito em volume final de 25µL contendo 0,4µM de cada oligonucleotídeo, 125µM de dNTPs (Amershan Pharmacia Biotech), 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl e 50mM de KC, 0,1mg/mL de gelatina, 1U de Taq DNA polimerase, 200ng de cDNA. A amplificação foi realizada com o seguinte ciclo: 94°C por 5 min para denaturação, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1min e 72°C por 2 min e extensão final de 72°C por 5 min. Como controle positivo foi realizada a amplificação utilizando-se amostras de DNA genômico. Os oligonucleotídeos para *TP53* amplificam no DNA um fragmento com cerca de 1180

pares de base (pb) e no cDNA 334pb. As reações foram realizadas em termociclador (Perkin Elmer 9700).

Os produtos resultantes do ensaio de *PCR* foram diluídos (1:1) em tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética os produtos foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado.

Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.

Genes	Sequências dos oligonucleotídeos
<i>TP53</i> (contaminação do RNA)	F- 5'- CAT CTT CTG CTT CTT CCC AG- 3' R- 5'- CTT AAA TAC CTT ACA CGC AA- 3'
<i>SFRP1</i> (RT-PCR)	F- 5'- GCC CGA GAT GCT TAA GTG TG -3' R- 3'- ATC TTC TTG TCG CCA TTT TC- 5'
β_2 - Microglobulina	F- 5'- ATC CAG CGT ACT CCA AAG ATT CAG -3' R- 5'- AAA TTG AAA GTT AAC TTA TGC ACG C-3'
<i>SFRP1</i> (Real Time-PCR)	F- 5'- GCCCGAGATGCTTAAGTGTG-3' R- 5'- GCACAGAGATGTTCAATGATG 3'
<i>CEP63</i> (Real Time-PCR)	F- 5'- AAC TCA TTC TTT GCC TTC AG -3' R- 5'- GAC CTC AGT CTT CTT TCT TC -3'
<i>EIF4G2</i> (Real Time-PCR)	F- 5'- CTG CAC GAA GCA CTA GAC GA -3' R- 5'- TGA GGA GCT CAA GGC ATA GC -3'
<i>GADPH</i> (Real Time-PCR)	F- 5'- TAC CAG GAA ATG AGC TTG ACA AAG -3' R- 5'- GAG CAC CAG GTG GTC CTT T -3'
<i>SFRP1</i> (metilação)	F- 5'- CCT CGG GCC CTC AGT CCC CAG CA -3' R- 5- CCA GCA GCT GGG TGC CCC TGC TCA -3
<i>HIC</i> (metilação)	F- 5'- GCT CAA AGC CCC AGG GTT TCT GG -3' R- 5- CGC CGC GCT TTC CGC ACA CT -3
<i>TP53</i> (controle de massa)	F- 5'- CAG GGC TGG TTT CCC AGG -3' R- 5'- CAG GCG GCT CATAGG GCA -3'
<i>M13 universal</i>	GA- 5'- CCCAGTCAC GACGTTGTAAAACG -3' GB-5- AGCGGATAACAATTTTCACACAGG -3'

3.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL POR DDRT-PCR (DIFFERENTIAL DISPLAY REVERSE TRANSCRIPTASE-PCR)

O método de *Differential Display RT-PCR* envolve a transcrição reversa do RNAm, utilizando-se oligonucleotídeos ancorados a cauda poli A, seguida por *PCR* na presença de um segundo oligonucleotídeo arbitrário. Podem ser utilizadas diversas combinações de oligonucleotídeos, permitindo a análise em média 15.000 transcritos. Os cDNAs obtidos são separados por eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida, sendo que a comparação entre o padrão de migração de diferentes amostras permite a identificação de fragmentos diferencialmente expressos

Análise de expressão gênica diferencial por *DDRT-PCR* foi realizada como descrito no manual do *kit RNImage* (GenHunter Corp., Nashville, TN). A Figura 3 mostra a representação esquemática do ensaio do *DDRT-PCR*

3.4.1 Síntese de cDNA.

Utilizando-se 0,01µg de RNA total foi realizado a síntese de cDNA em reação contendo 25 mM de Tris-HCl pH-8,3, 37,6 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 5 mM de DTT, 20 mM de dNTP, e 1mM de cada um dos 3 oligonucleotídeos de ancoragem: H-T11 A, H-T11 C e H-T11 G. A reação foi incubada por 5min a 65°C, por 60min a 37°C e 5 min a 75°C. Depois de 10 min do período de incubação a 37°C foi adicionado 100 U da enzima *Transcriptase Reversa- MMLV*.

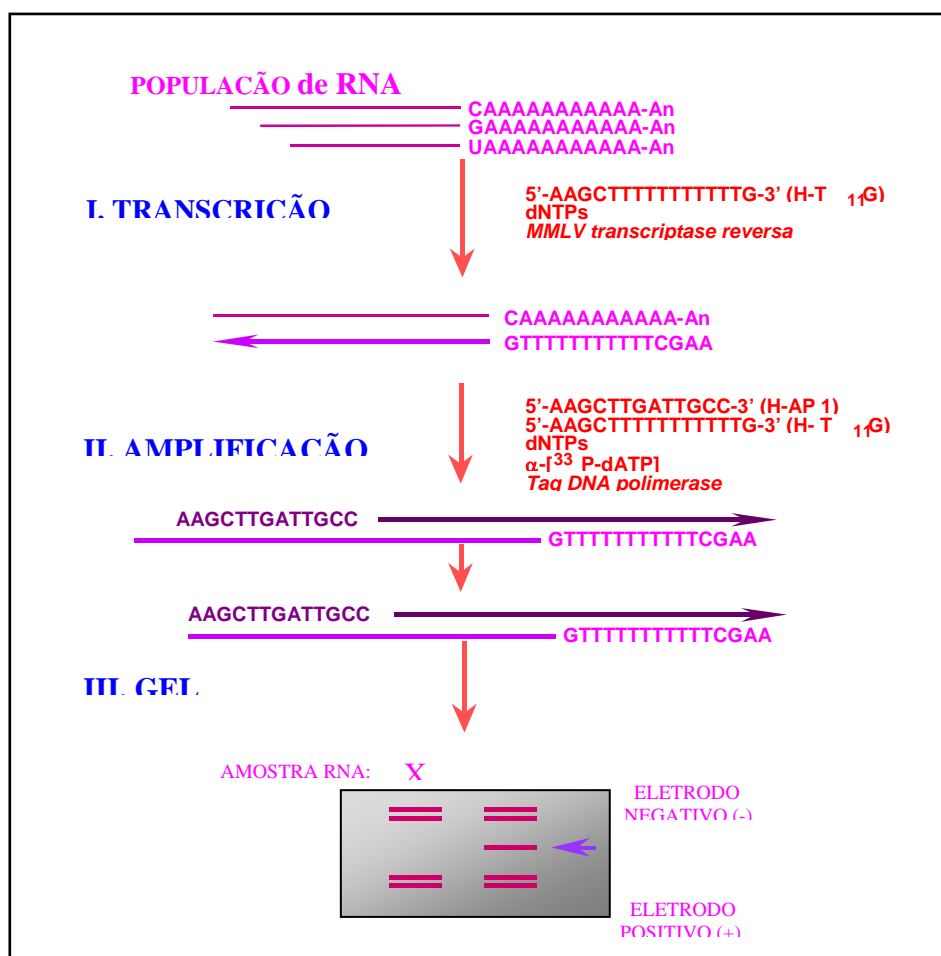


Figura 3 - Representação esquemática do ensaio de *Differential Display*. As linhas mais estreitas representam RNA e as linhas mais espessas representam o cDNA.

3.4.2 Amplificação do cDNA por *PCR*

O ensaio de *PCR* foi feito num volume final de 20 μ L contendo cerca de 100pg de cDNA, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH-8,4, 1,5mM de MgCl₂ e 0,01mg/mL de gelatina, 2mM de dNTPs, 0,2 μ M do oligonucleotídeo de ancoragem, 1 μ M do oligonucleotídeo arbitrário (H-AP 1, H-AP 2, H-AP 3 e H-AP 4), 2 μ Ci de α -[P³³] dATP (Atividade específica 2000 Ci-mmoles) (Amersham Pharmacia Biotech) e 1U da enzima Taq DNA polimerase. A amplificação foi feita em 40 ciclos de 94°C por 30 seg para denaturar a amostra, 40°C por 2 min para a hibridação dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg para a extensão e em seguida 72°C por 5 min.

Os produtos resultantes da amplificação foram diluídos (2:1) em solução contendo 95% de formamida, 10mM EDTA pH 8,0, 0,09% de xileno cianol, 0,09% de azul de bromofenol, incubados por 2 min a 80°C e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% contendo uréia a 7M. A corrida foi realizada em solução de BTE 1X (0,045mM de Tris-HCl, 0,045mM de ácido bórico, 0,1M de EDTA pH-8,6) a 60 Volts por 3 horas, à temperatura de 45 a 50°C.

Após a eletroforese o gel de poliacrilamida foi transferido para papel 3MM a seco a vácuo, e exposto ao filme de raio X (Xomat – KodaK) por um período de 14 a 24 horas a -70°C.

3.4.3 Recuperação e Reamplificação dos Fragmentos Diferencialmente Expressos

As bandas de interesse foram cortadas do gel de poliacrilamida com estilete e transferidas para tubos onde foram eluídas por 10 min em 100 μ L de água destilada e incubadas em banho-Maria por 15 min. Centrifugou-se por 2 min e ao sobrenadante adicionou-se acetato de sódio a 0,3M, 50 μ g de glicogênio e etanol absoluto, incubou-se por um período de 14-16 h a -20°C . Após a incubação centrifugou-se por 30 min a 10.000 rpm à temperatura de 4°C , sendo o precipitado lavado com etanol 85% e centrifugado novamente por 20 min. O precipitado foi seco em centrífuga a vácuo por 10 min e ressuspendido em 10 μ L de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A reamplificação do cDNA foi feita por PCR em um volume final de 40 μ L contendo 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH= 8.4, 0,1mg/mL de gelatina, 1,5 mM MgCl₂, 20mM de solução de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), 0,2 μ M de oligonucleotídeo de ancoragem, 1 μ M de oligonucleotídeo arbitrário (o mesmo grupo de oligonucleotídeos utilizados anteriormente), 4 μ L do cDNA recuperado e 2 unidades da enzima Taq DNA polimerase. A amplificação foi feita em 40 ciclos de 94°C por 30 seg para a denaturação, 40°C por 2 min para hibridação dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg para extensão, seguidos por um período de 5 min a 72°C para extensão final.

Os produtos gerados por PCR são diluídos (1:1) em tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,25 μ g/mL de brometo de

etédeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética os produtos foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado. Estes produtos foram submetidos à clonagem, como segue.

3.5 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS REAMPLIFICADOS

Os fragmentos reamplificados foram analisados em gel de agarose para determinar a qualidade e quantidade dos fragmentos, posteriormente foram clonados em vetores (pUC18) e inseridos em bactérias competentes (*E. coli XLI Blue*), usando-se o *Kit Sure Clone* (Amersham Pharmacia Biotech) seguindo o manual do fabricante, e depois seqüenciados.

Os produtos de *PCR* foram preparados para a ligação com o vetor de clonagem, através da remoção da base na extremidade 3' do fragmento e fosforilação da extremidade 5', utilizando-se a enzima *DNA polymerase klenow fragment I*, que tem atividade exonuclease 3'-5', e foram concomitantemente fosforilados pela enzima *T4 polynucleotide kinase* em uma reação contendo 5µL do produto de PCR, 8,9U de *DNA polymerase klenow fragment I*, 1X tampão *Bluting/kinasing*, 7U de *T4 polynucleotide kinase* e H₂O para completar 20µl e a reação foi incubada a 37°C por 30 min. Em seguida foi feita extração do DNA adicionando-se 20µL de feno/clorofórmio/isoamílico, na proporção 25: 24: 1, centrifugou-se o sobrenadante que foi purificado em coluna *MicroSpin* (Sephacryl S-200).

Os produtos de PCR com as extremidades abruptas foram ligados ao vetor de clonagem (pUC18 *SmaI/BAP*), utilizando-se 5µL do produto purificado em coluna

MicroSpin, 0,25µg de vetor defosforilado, 1X tampão de ligação, 10mM de DTT e 7U de T4 DNA Ligase e H₂O para completar 20µL, a reação foi incubada a 16°C por 1h e 40 min.

Em seguida o vetor com o inserto foi transfetado em bactéria competente (*E. coli XLI blue*- Stratagene), utilizando-se 10µL do produto da ligação, 0,02M de MgCl₂, 0,01M de CaCl₂ e H₂O para completar 50µL e foi adicionado 50µL de *E. coli* competente, a reação foi incubada a 4°C por 20min, depois a 21°C por 10min e adicionado 1mL de meio LB (5g/L de extrato de levedura, 10g/L de triptona e 5g/L de cloreto de sódio pH 7,2) e incubado a 37°C por 1h sob agitação de 200 rpm.

As bactérias transformadas foram incubadas em placas de Petri, contendo meio LB sólido (contendo 2,2 % de Bacto-Agar- Difco), 0,001% de ampicilina e 0,04% de tetraciclina, em estufa a 37°C por 12 h aproximadamente. Depois de crescidas as bactérias, foram selecionadas algumas colônias e transferidas para placas, com capacidade para 96 amostras, contendo meio LB líquido e 0,001% de ampicilina e foram incubadas a 37°C sob agitação de 160 rpm por um período de 10 a 12 h.

3.5.1 Amplificação por PCR dos fragmentos clonados

Uma alíquota (1µL) das bactérias crescidas em meio LB líquido foi submetida à amplificação por PCR com volume final de 20µL contendo, 125µM de dNTPs (Amershan Pharmacia Biotech), 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl e 50mM de KC, 0,1mg/mL de gelatina, 1U de Taq DNA polimerase e 0,6 µM de cada oligonucleotídeo (M13 universal) (Tabela 3). A amplificação foi realizada em

termociclador (Perkin Elmer 9700) nas seguintes condições: 95°C por 4 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, e 72°C por 5 min.

Os produtos gerados por *PCR* foram diluídos (1:1) em tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética os produtos foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado e em seguida foram selecionados alguns produtos amplificados para serem seqüenciados.

3.6 SEQÜENCIAMENTO DO DNA

As reações de sequenciamento foram feitas em volume final de 20µL contendo cerca de 200ng de cDNA, 8µL do *DYEnamic ET Dye terminator cycle Sequency Kit for Mega Bace* (Amersham Pharmacia Biotech), 0,2µM pmol de oligonucleotídeo (M13 universal-GA) e H₂O para completar 20µL. A amplificação foi feita em 30 ciclos de denaturação a 96°C por 15 seg, hibridação do oligonucleotídeo a 50°C por 10 seg e extensão a 60°C por 1 min e bloqueada por resfriamento a 4°C.

Os produtos foram precipitados com etanol e acetato de amônio 7,5M e ressuspendido em 5µL de *Loading Buffer* (formamida 70%, 1mM de EDTA) e sequenciados. O sequenciamento foi realizado através do sequenciador automático *MegaBace 1000 (DNA Sequencing System)*.

3.7 ANÁLISE E ANOTAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

As seqüências geradas foram submetidas ao programa *Sequencher 3.0* (Gene Codes Corporation, Inc) para serem retiradas às seqüências terminais e as seqüências dos vetores. Em seguida foi feita busca de similaridade à seqüências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* usando o algoritmo *Blast* (*Basic Local Alignment Tool*) e o algoritmo *Blat* (*Blast Like Alignment Tool*) (www.ncbi.nlm.nih.gov e www.genome.edu.uscs, respectivamente).

Os resultados obtidos foram então analisados utilizando-se as informações disponíveis no *Locus Link* (www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink), *Omin* (www.ncbi.nlm.nih.gov/omin), *Gene Ontology* (www.geneontology.org).

3.8 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL

Após a anotação gênica foram selecionados alguns transcritos diferencialmente expressos a fim de realizar os ensaios de validação. Com base nas seqüências desses transcritos, foram desenhados oligonucleotídeos com o auxílio do programa *Primer3* (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi).

3.8.1 RT-PCR

O cDNA das amostras a serem analisadas foi sintetizado como descrito no item 3.3.1 e então foi submetida a amplificação por *PCR* utilizando-se oligonucleotídeos para amplificação do gene controle (*β_2 -microglobulina*) e do gene *SFRP1* (Tabela 3).

A amplificação por *PCR* do cDNA do gene *SRFP1* foi feita em um volume final de 25 μ L contendo 0,6 μ M de cada oligonucleotídeo, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH= 8.4, 0,01mg/mL de gelatina, 1,5 mM MgCl₂, 120 μ M de cada deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP), aproximadamente 100ng do cDNA 0,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi feita nas seguintes condições: 94°C por 5 min, 32-35 ciclos de 94°C por 1 min para a denaturação, 55°C por 1 min para hibridação dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 min para extensão, seguidos por um período de 5 min a 72°C para extensão final. Foi amplificado o gene β_2 -*Microglobulina* para controle da reação e para a normalização da massa para cada reação, nas mesmas condições descritas acima.

Os produtos resultantes do ensaio de PCR foram diluídos 1:1 em tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,25 μ g/mL de brometo de etídeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética os produtos foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado.

3.8.2 *Real Time -PCR*

O ensaio de *Real Time-PCR* foi realizado utilizando-se o aparelho *GeneAmp 5700 Sequence Detector* (Applied Biosystems). Os cDNAs para essas análises foram sintetizados como descrito no item 3.3.1.

A técnica de *Real Time-PCR* foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do *kit SYBR Master qPCR Super Mix UDG* (Invitrogen), em um volume total de 25 μ L, utilizando-se 0,4 μ M dos oligonucleotídeos dos genes

SFRP1, *CEP63* e *EIF4G2* e 0,3 μ M dos oligonucleotídeos do gene *GAPDH*. Os oligonucleotídeos utilizados estão apresentados na Tabela 2. A amplificação foi realizada com 1 ciclo de 50° por 2 min, 95° por 5 min, seguidos por 40 ciclos (95° por 30 seg, 55° por 30 seg e 72° por 30seg). Cada amostra de cDNA foi analisada em duplicata.

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido pelo corante *SYBR Green* que se intercala a dupla fita do DNA. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) são obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento no sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de *PCR* começa a ser detectado.

A expressão gênica foi quantificada relativamente à expressão de um gene controle (*GAPDH*) e também foi normalizado de acordo com um *pool* de amostra de referência (tecido normal). A relativa expressão foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde os valores do $\Delta CT = CT$ do gene alvo - CT do gene de referência (*GAPDH*); $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ da amostra do tumor - ΔCT da amostra de referência (tecido normal).

3.8.3 Análise de Metilação

3.8.3.1 Digestão do DNA com Enzimas de Restrição

O DNA genômico foi submetido à digestão com as enzimas de restrição: *MspI* e *HpaII* (Amershan Pharmacia Biothec). A enzima *HpaII* cliva as seqüências CCGG do DNA, mas se a segunda citocina estiver metilada, esta enzima é incapaz de reconhecer este sítio. A enzima *MspI* cliva todas as seqüências CCGG, independente de seu estado de metilação.

Cinco microgramas de DNA foram submetidos à digestão com 50 unidades de cada enzima de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi incubada a 37°C por um período de 16 a 18 h e posteriormente incubada a 70°C por 15 min para inativar a enzima.

Após a digestão, o DNA foi precipitado adicionando-se 0,3M de acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto e incubado a -20°C por um período de 12 a 14 h. Passado esse tempo a reação foi centrifugada por 20 min a 10.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 2,5 volumes de etanol 75% e novamente centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e as amostras foram secas a vácuo e diluídos em TE.

3.8.3.2 Controle de massa após a digestão e precipitação

Para a verificar a massa do DNA após a digestão com as enzimas e a precipitação, foi realizada amplificação por *PCR* utilizando oligonucleotídeos para o gene *TP53* (Tabela 3). Estes oligonucleotídeos amplificam o exon 6 do gene *TP53* e não contem sítios de restrição para as enzimas *HpaII* e *MspI*. A reação foi realizada utilizando-se 100ng de DNA submetido à digestão, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl e 0,01mg/mL de gelatina, 0,4μM de cada oligonucleotídeo, 125μM de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase, para um volume final de 25 μL. Foram amplificadas com o seguinte ciclo: 94°C por 5 min para denaturação, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C por 1min e 72°C por 2min, 72°C por 5 min para a extensão final

Para verificar se a digestão foi completa, foi realizada amplificação por *PCR* utilizando-se oligonucleotídeos que amplificam a região promotora do gene *HIC*

(Tabela 3), esta região contém os sítios de restrição para as enzimas (CCGG), se a digestão for completa não há formação de produtos, exceto nos controles positivos (DNA não digerido). As condições de reação foram idênticas ao do *TP53* exceto na temperatura de hibridação dos oligonucleotídeos, que foi de 55°C.

Os produtos gerados por *PCR* foram diluídos (1:1) em tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética os produtos foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado.

3.8.3.3 MS-PCR (*Methylation-Sensitive –Polimerase Chain Reaction*)

Os DNAs submetidos à digestão pelas enzimas *HpaII* e *MspI* foram amplificados por *PCR* utilizando-se oligonucleotídeos que amplificam parte da região promotora do gene *SFRP1*.

O ensaio de *PCR* para amplificar o gene *SFRP1* foi realizado nas seguintes condições: 200ng de DNA, 0,6µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 3), 125µM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl e 0,01mg/ml de gelatina, 1U de Taq DNA polimerase para um volume final de 25 µL. Foram amplificadas nas seguintes condições: 94°C por 5 min para denaturação, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 63°C por 2min e 72°C por 2min, 72°C por 5 min para a extensão final.

Os produtos gerados por *PCR* foram diluídos (1:1) em tampão de aplicação (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 15% de ficoll 400) e

submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídeo. A corrida foi feita em solução de BTE 1X (Tris 0,089M, ácido bórico 0,089M e EDTA 0,002M) a 80 Volts. Após a separação eletroforética os produtos foram visualizados em transiluminador com luz Ultra-Violeta e o gel foi fotografado.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre o *status* de metilação do gene *SFRP1* e os parâmetros clínicos patológicos e demográficos foi realizada utilizando-se o Teste de χ^2 e o Teste exato de Fisher.

Para determinar o perfil de expressão dos transcritos dos genes *SFRP1*, *EIF4G2* e *CEP63* foi estabelecido o *cut-off* de 2 vezes em relação a expressão desses transcritos no tecido normal ($\geq 2,0$ para aumento de expressão, $\leq 0,5$ para diminuição de expressão e o intervalo de 0,5 a 2,0 para a expressão normal). Teste de χ^2 e o Teste exato de Fisher foram utilizados para associar a expressão dos genes e os parâmetros clínicos e demográficos.

Todos resultados foram considerados estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. O *Software* utilizado para as análises estatísticas foi o SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

4 RESULTADOS

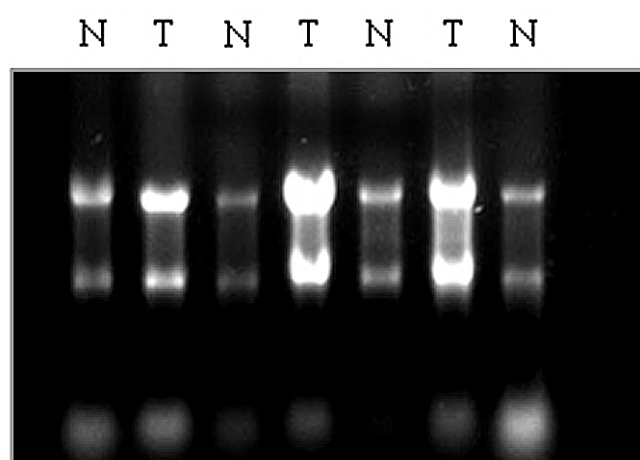
Analisando a frequência do câncer de bexiga na população estudada, em relação ao sexo, foi observada uma proporção de 3,46 homens afetados para cada mulher, corroborando os dados da literatura, os quais demonstram a proporção de 3 a 4 homens com câncer de bexiga para cada mulher afetada (WAI e MILLER 2002). A incidência do câncer de bexiga é maior em pessoas idosas em nossa população, 70,5% dos pacientes apresentaram 60 anos ou mais. Não foi possível realizar a análise correlacionando a raça dos pacientes, bem como os hábitos de vida (tabagismo, consumo de álcool, café, hábitos alimentares) com a incidência ou estadiamento dos tumores, pois estas informações não constavam nos prontuários dos pacientes.

4.1 EXTRAÇÃO DE RNA E DNA

Iniciamos da extração do RNA das amostras pela técnica fenol-guanidina isotiocianato descrita por CHOMCZYNSKI e SACCHI (1987), entretanto estávamos obtendo pouca quantidade de RNA e também amostras com grau de degradação. Por essas razões, optamos por extrair o RNA usando o reagente Trizol. Através desse método verificamos uma melhora nos resultados, com a obtenção de maior quantidade de RNA e amostras menos degradadas.

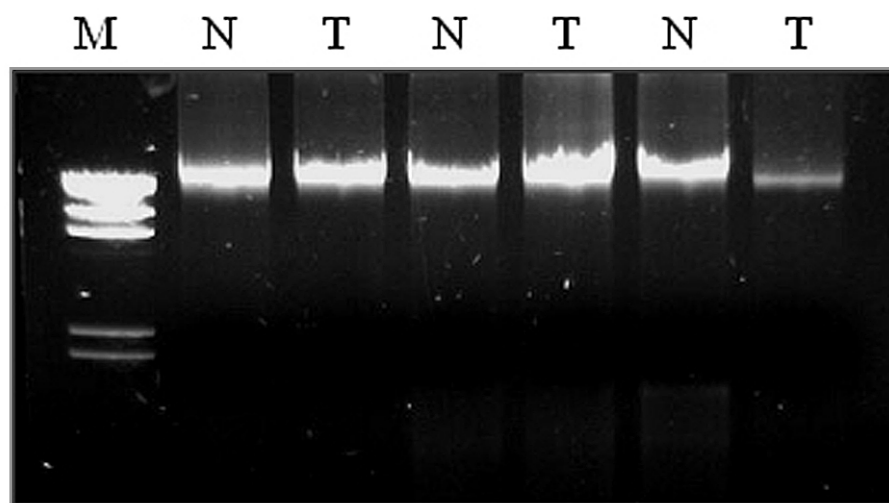
Obtivemos o RNA de boa qualidade de 63 amostras, e destas 58 foram utilizadas neste estudo. A Figura 4 mostra gel de agarose/formaldeído de RNA de tumor e tecido normal de bexiga.

As amostras de DNA extraídas apresentaram boa qualidade e baixa quantidade de degradação. Obtivemos DNA de boa qualidade de 88 amostras e estas foram utilizadas neste estudo. A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose. A Figura 5 mostra gel analítico de DNA de tumor de bexiga.



Legenda: T, tecido tumoral; N, tecido normal.

Figura 4 - Gel de agarose 1% contendo formaldeído, representativo da análise da qualidade e integridade do RNA extraído de tumor e tecido normal de bexiga



Legenda: M: marcador Phago λ /Hind III; N, tecido normal; T, tecido tumoral

Figura 5 - Gel de agarose 1% representativo da análise da qualidade e integridade do DNA extraído de amostras tecido tumoral e normal e bexiga.

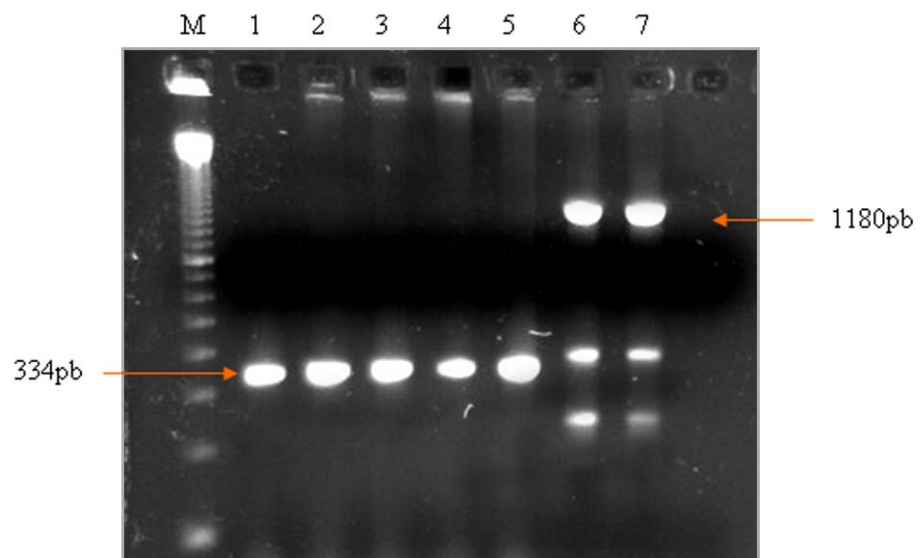
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES

Para se determinar o padrão de expressão gênica entre os CTT e o tecido normal de bexiga utilizamos a técnica de *Differential Display Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR)* (LIANG e PARDEE 1992). Para a realização de *DDRT-PCR*, foram utilizados 5 *pools* de RNA, cada *pool* contendo 5 amostras de RNA. Os *pools* foram formados de acordo com as características histopatológicas e o estadiamento clínico, foram divididos em: *pool* 1, tumor superficial-pa, baixo grau (GI); *pool* 2, pTa alto grau (GIII); *pool* 3, tumor superficial pT1GIII; *pool* 4, tumor invasivo T2G III e *pool* 5, tecido normal.

Como a técnica de *DDRT-PCR* demanda RNA de alta qualidade e livre de contaminação por DNA genômico, o RNA extraído foi submetido ao tratamento com a enzima *DNase I*. A fim de confirmar que o tratamento com *DNase I* foi efetivo, foi realizada a síntese de cDNA dos *pools* de RNA e a amplificação por *RT-PCR* utilizando oligonucleotídeos para o gene *TP53*, os quais abrangem regiões intrônicas. Como pode ser observado na Figura 6, houve eliminação do DNA nos *pools* de RNA, demonstrando a eficiência do tratamento, pois esses oligonucleotídeos amplificam um fragmento de aproximadamente 1180pb no DNA e um fragmento de 334pb no cDNA. Esse procedimento foi seguido em todos os experimentos realizados.

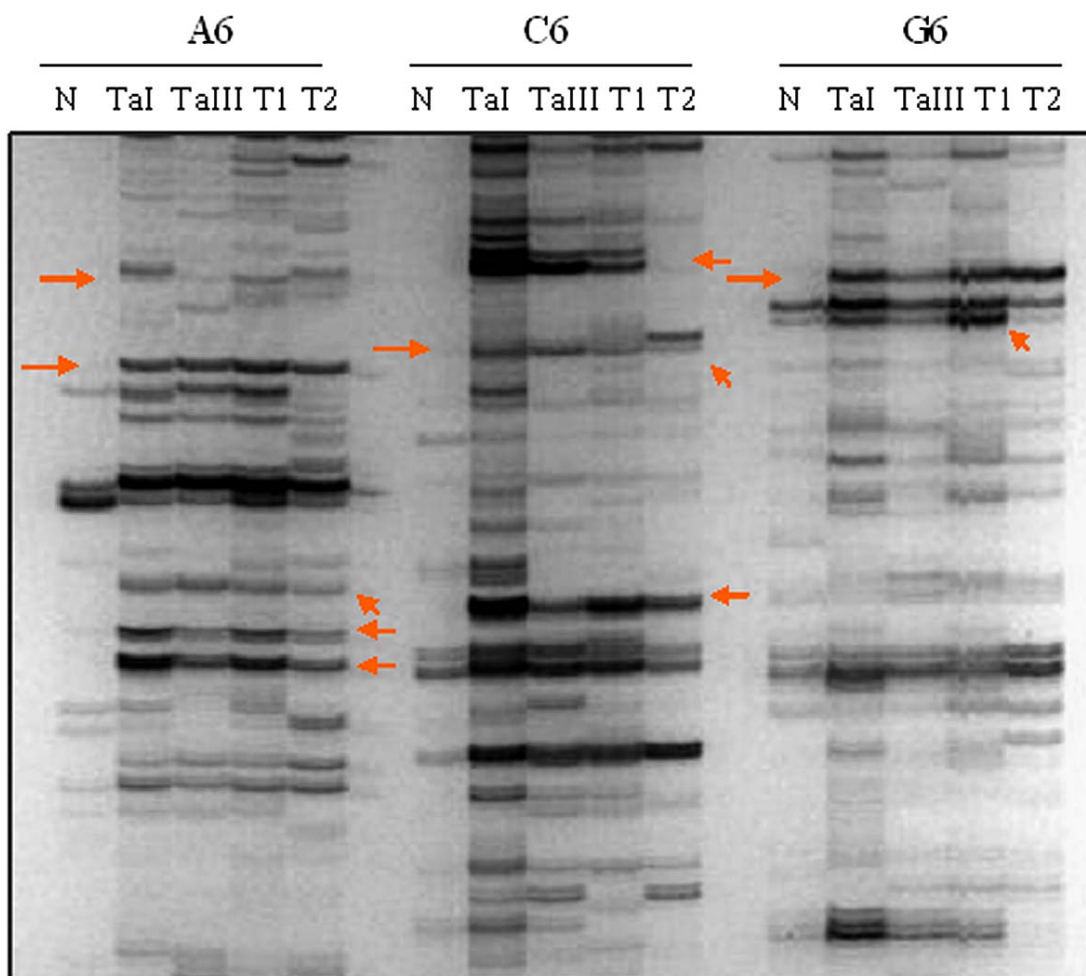
Após o tratamento com a enzima *DNase I* e a confirmação de que não havia contaminação com DNA foi realizada a técnica de *DDRT-PCR*. O cDNA foi sintetizado utilizando-se oligonucleotídeos de ancoragem (A, C e G) e então submetidos a amplificação por *PCR* utilizando-se diferentes combinações de

oligonucleotídeos de ancoragem e arbitrários na presença de [α -P³³]dATP (conforme descrito em Material e Método). Foram utilizados 3 oligonucleotídeos de ancoragem e 4 oligonucleotídeos arbitrários, em um total de 12 combinações. Os produtos de *PCR* foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante e exposto a filme de raio-X. A Figura 7 mostra um autorradiograma representativo das análises de *DDRT-PCR*.



Legenda: Os produtos da síntese de cDNA foram submetidos a *RT-PCR* para a amplificação do gene *TP53*. As amostras 1, 2, 3, 4 e 5 representam os cDNAs (334pb) e as amostras 6 e 7 são amostras controles de DNA (1180pb). M marcador de peso molecular 100 bp.

Figura 6 - Gel de agarose 2% representativo da análise da contaminação dos *pools* de RNA por DNA genômico.



Legenda: A amplificação foi realizada utilizando-se 3 oligonucleotídeos de ancoragem (A, C e G) e o oligonucleotídeo arbitrário HPA-6 comparando-se o *pool* de amostras de tecido normal, com os *pools* dos tumores pTaGI, pTaGIII, pT1GIII, pT2GIII. As setas indicam alguns fragmentos diferencialmente expressos.

Figura 7 - Autorradiograma representativo das análises da expressão diferencial de genes através da técnica *DDRT-PCR*.

As primeiras reações do *DDRT-PCR*, foram realizadas utilizando-se os *pools* de tecidos normais, tumores pTaGI, pTaGIII e pT1GIII. Na época que iniciamos essa técnica, não tínhamos amostras suficientes de tumores invasivos pT2GIII, as demais reações foram realizadas utilizando-se todos os *pools* de RNA.

Entre as 12 combinações de oligonucleotídeos, 82 fragmentos diferencialmente expressos foram recortados do gel, eluídos em água e reamplificados por *PCR*. Alguns fragmentos de cDNA reamplificados são mostrados na Figura 8.

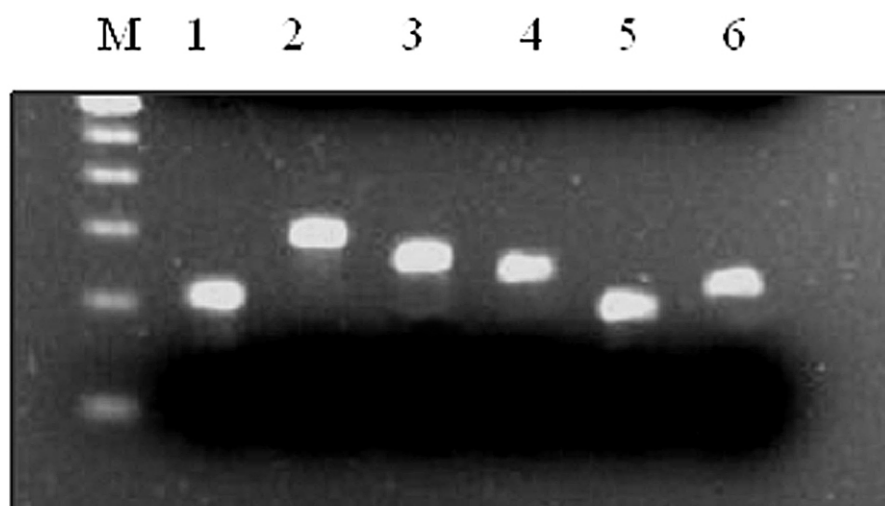
Esses fragmentos reamplificados foram clonados em vetor pUC18 e transfectados em bactérias competentes (*E. coli XL1 Blue*), essas bactérias cresceram em placas contendo meio/Agar.

Para cada fragmento diferencialmente expresso foi selecionado de 8 a 12 colônias de bactérias contendo o inserto e foram incubadas em meio líquido e amplificadas por *PCR* utilizando-se os oligonucleotídeos universal M13. A Figura 9 mostra a amplificação por *PCR* de colônias de bactérias contendo os fragmentos a serem seqüenciados. Alguns clones foram selecionados por tamanho e seqüenciados no seqüenciador automático *MegaBace 1000* (Amersham Pharmacia Biotec).

Foram analisados os eletrofluorogramas de cada seqüência (Figura 10) e as seqüências foram submetidas ao programa *Sequencher 3.0* para a remoção das regiões contendo vetor, iniciadores e redundância. As seqüências que apresentaram boa qualidade foram utilizadas para a anotação funcional, ou seja foram submetidas à busca por similaridade às seqüências depositadas no banco de dados do *National Center of Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando os algoritmos *Blast* e *Blat* (www.genome.uscs.edu).

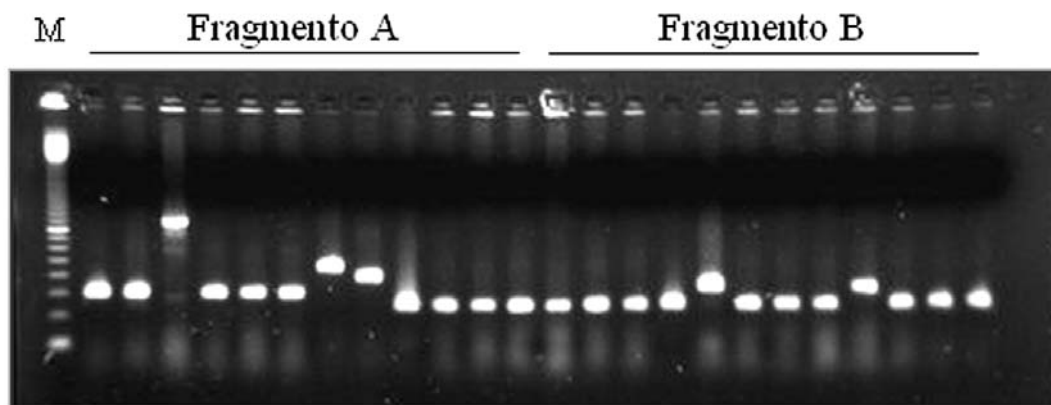
Na análise de anotação dos fragmentos diferencialmente expressos, foram identificados 74 transcritos diferentes. Desses 74 transcritos, 53 apresentaram similaridade com genes conhecidos, 12 apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas e 9 apresentaram similaridade a EST ou RNAm, para essas regiões ainda não há transcrito *RefSeq* descrito. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4

Identificamos transcritos que apresentaram similaridade a genes conhecidos que participam de diferentes vias biológicas, como: diferenciação celular, processamento de RNA, regulação da transcrição, fator do início de tradução, resposta imune, síntese de proteína, adesão celular, ligação a ions, transdução de sinal, biosíntese de ribonucleotídeos, metabolismo de esteróis, entre outros.



: **Legenda:** M, marcador de peso molecular 100 bp.

Figura 8 - Gel de agarose 2% representativo da reamplificação por *PCR* dos fragmentos de cDNA extraídos dos géis de *DDRT-PCR*.



Legenda: Os produtos reamplificados dos fragmentos recuperados dos géis de *DDRT-PCR* foram clonados no vetor pUC18 e utilizados para transformação de bactérias. Algumas colônias foram selecionadas e amplificadas por *PCR* utilizando-se oligonucleotídeos M13. M, marcador de peso molecular 100pb.

Figura 9 - Gel de agarose 1,5% representativo da amplificação de diferentes clones provenientes de dois fragmentos (A e B) de cDNA extraído dos géis de *DDRT-PCR*.

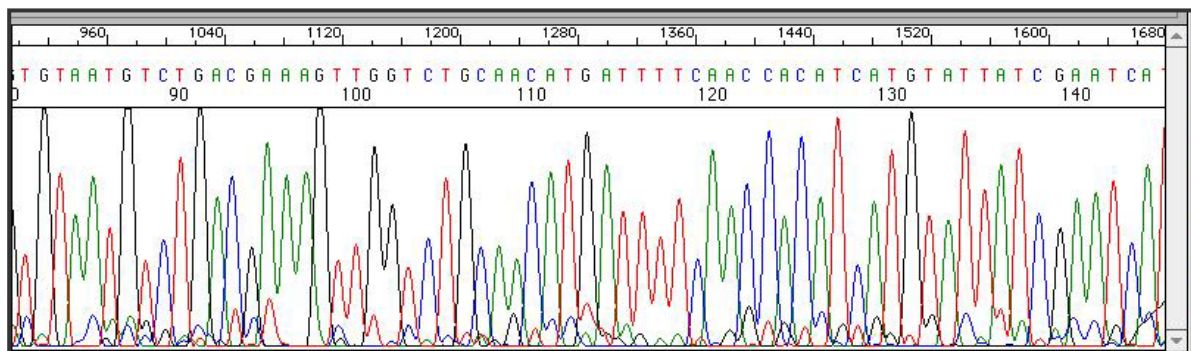


Figura 10 - Eletrofluorograma representativo do seqüenciamento de uma amostra através do sequenciador automático *MegaBace 1000*.

Tabela 4 - Resultados dos genes diferencialmente expressos entre o tecido normal e os carcinomas de células transicionais de bexiga.

Unigene	Acession N°	Descrição	Localização cromossômica
Genes expressos em tecido normal			
Hs.213424	NM_003012	SFRP1 (secreted frizzled –related protein 1)	8p12-p11
Hs.422113	NM_145806.2	ZNF511 (zinc finger protein 511)	10q26.3
Hs.106650	NM_017866.3	FLJ20533 hipotético proteína	8q21.11
Hs.480763	NM_012118.2	CCRN4L (carbon catabolite repression 4-like)	4q31
Gene expresso em tecido normal e carcinomas pT1GIII			
Hs.516646	NM_004379.2	CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1)	2q33.3
Hs.531788	NM_032574.1	LOC84661 dpy30 like protein	2p22.3
Genes expressos em tecido normal e carcinomas pTAGI, pTaGIII			
Hs.382168	NM_181659	NCOA3 (nuclear receptor coativator 3 isoform a)	20q
Hs.23439	NM_152400	FLJ39370 hipotético proteína	4q25
Hs.508514	NM_003576	STK24 (serine/threonine kinase 24/ STG20 homolog)	13q
Genes expressos em tecido Normal e carcinomas pTaGI, pTaGIII, pT1GIII			
Hs.280987	NM_002439	MSH3 (mutS homolog3)	5q14.1
Hs.523463	NM_000990.2	RPL27A (ribosomal protein L27a)	11p15.4
Hs.533977	NM_006472	TXNIP (thioredoxin interacting protein)	1q21.1
	N32847	EST	1q21
	CA313357	EST	5q12
Hs.485635	NM_016277	RAB23 (Ras-related protein rab-23)	6p12
Hs.466929	NM_024108	MGC2650 hipotético proteína	19q13.32
Hs.497159	NM_030806	C1orf21 (chromosome 1 open reading frame 21)	1q25.3
Hs.437966	NM_000318	PXMP3- (peroxisomal membrane protein 3)	8q21.11
Hs.516079	NM_153812.1	PHF13 (PDH finger protein 13)	1p36.31
Hs.297411	NM_144660	SAMD8 (sterile alpha motif domain)	10q22.2

Unigene	Acession N°	descrição	Localização cromossômica
Genes expressos em carcinomas pTaGI			
Hs.334603	NM_031922.2	REPS1 (RALBP1 associated Eps domain containing 1)	6q24.1
Hs.445218	AB032945	MYO05B (myosin VB)	18q21
Hs.58663	NM_022736	MFSD1 (Major facilitator superfamily domain containing)	3q25.32
Hs.5308	NM_003333	UBA52 (ubiquitin and ribosomal protein L40 precursor)	19p13.11
Hs.103755	NM_003821.4	RIPK2 (receptor interacting serine-threonine kinase 2)	8q21.3
Hs.77348	NM_000960	HPGD (hydroxy prostaglandin dehydrogenase 15 (NAD))	4q34.1
Hs.11463	NM_016308	UMP-CMPK (UMP-CMP kinase)	1p33
Hs.444818	NM_003663	CGGBP1 (CGG triplet repeat binding protein 1)	3q11.1
Hs.171802	NM_173647	RNF 149 (ring protein 149)	2q11.2
Gene expresso em carcinomas pTaGI, pTaGIII			
Hs.512627	NM_018142	FLJ10569 hypothetical protein	8p21.3
Hs.193300	NM_024860.1	FLJ21148 hypothetical protein	16q21
Genes expressos em carcinomas pT1GIII			
Hs.443673	NM_014925	KIAA1002 hypothetical protein	12q13.3
	AI799130	EST	13q21
Genes expressos em carcinomas pTaGIII e pT1GIII			
Hs.32567	NM_021967	SERF1A (small EDRK-rich factor 1 A, telomeric)	5p13.2
Hs.443301	NM_02518.2	Cep63 (centrosome protein Cep 63)	3q22.1
Hs.502302	NM_001752.1	CAT (catalase)	11p14
	CD104441	Est	M
	U75997	EST	5p

Unigene	Acession N°	descrição	Localização cromossômica
Genes expressos em carcinomas pTaGI, pTaGIII, pT1GIII			
	CR627367	RNAm	9p22
Hs.520259	NM_015550.2	OSBPL3 (oxysterol binding protein-like protein 3 isoform)	7p15.3
Hs.176280	NM_024646	FLJ13456 hypothetical protein	1p
Hs.446588	NM_001017.2	RPS13 (ribosomal protein 13)	11p15.1
Hs.187657	NM_024661.2	FLJ12436 hypothetical protein	3p21.31
	BF061555	EST	7q
Hs.125849	NM_007175.5	SPFH2 (SPFH domain family member 2 isoform 1)	8p12
Hs.34851	NM_016262.3	TUBE 1 (tubulin epsilon 1)	6q21
Hs.500101	NM_003373.3	VCL (vinculin isoform VCL)	10q22.2
	BQ424351	EST	18q
Hs.500067	NM_021132.1	PPP3CB (protein phosphatase 3 (formerly 2B) catalytic)	10q22.2
Hs.8102	NM_001023.2	RPS20 (ribosomal protein S20)	8q12.1
Hs.179986	NM_005803	FLOT1 (flotilin1)	6p21..33
Hs.126221	NM_003274	TMEM1- (transmembrane protein 1)	21q22.3
Hs.326035	NM_001964	EGR1 (early growth response 1)	5q31.2
Hs.203637	NM_002670	PLS1 (plastin 1)	3q
Hs.523262	NM_004872	C1orf8 (chromosome 1 open reading frame 8)	1p32.3
Hs.521215	NM_018295.1	FLJ11000 hipothetical protein	7q33
Hs.369825	NM_021180.2	TFCP2L4 (sister of mammalian grainyhead protein isoform)	1p36.11
	BX330672	EST	13q
Hs.522729	NM_022838.2	ARMCX5 (armadillo repeat containing X-linked 5)	Xq22.1
Hs.351875	NM_004374.2	COX6C (cytochrome C oxidase subunit VIC proprotein)	8q22.2

Unigene	Acession N°	Descrição	Localização cromossômica
0Genes expressos em carcinomas pTaGI, pTaGIII, pT1GIII, pT2GIII			
Hs.372914	NM_006096	NDRG1 (N-myc downstream regulatd gene 1)	8q24.22
HS.368084	NM_133259	LRPPRC (leucine-rich PPR motif containing)	2p21
Hs.533282	NM_007363	NONO (non Pou domain –containing octamer)	Xq13.1
Hs.191518	NM_001357	DDX9 (dead/h (Asp-Glu-Ala-Asp/His) boxx polypeptide	1q25.3
	BU689554	Est	9q13
Hs.44685	NM_016422	RNF141 (ring finger protein 141)	11p15.4
Hs.462086	NM_001212	C1QBP (complement compenent 1, q subcomponente nding)	17p13.2
Hs.183684	NM_001418	EIF4G2 (eukaryotic translation initiation factor 4)	11p15.4
Hs.292356	NM_000397.2	CYBB (cytochrome b-245 beta polypeptide)	Xp11.4
Hs.524899	NM_005870.3	SAP18 (sin 3 associated polypeptide p18)	13q12.11
Hs.443891	NM_020925.1	KIAA1573 hipothetical protein	1p31.3
Genes expressos em carcinomas pTaGI e pT2GIII			
Hs.497873	NM_025160	WDR26 (WD repeat domain 26)	1q42.12
Hs.478067	NM_020169.2	LXN (latexin)	3q25.3
Gene expresso em carcinomas pT2GIII			
Hs.464563	NM_015210.1	KIAA0802 hipothetical protein	18p11.22

4.3 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL

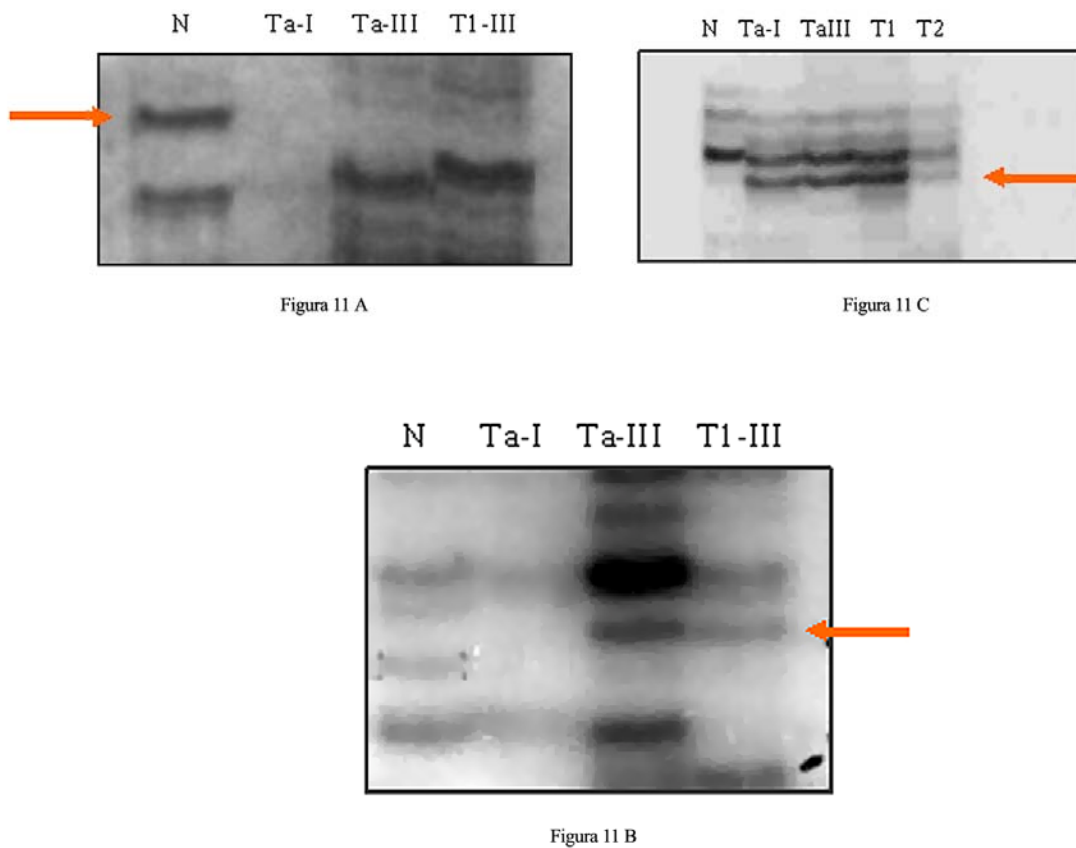
A fim de confirmarmos a expressão diferencial nos CTT de bexiga, alguns genes foram selecionados através da anotação funcional e submetidos a ensaio de análise de expressão por *Real-Time-PCR*.

Para a escolha dos genes a serem validados utilizamos os seguintes critérios: ter similaridade a genes conhecidos; função gênica e localização cromossômica, regiões que já foram identificadas alteradas em câncer de bexiga.

Foi selecionado para ser validado um fragmento que apresentou similaridade ao gene *SFRP1* (*secreted frizzled related protein 1*). Este fragmento foi expresso apenas no tecido normal quando comparado com os tumores, através da técnica de *DDRT-PCR* (Figura 11A). O gene *Secreted Frizzled Related Protein 1* (*SFRP1*) (*Acession Number* NM_003012), está localizado na região do cromossomo 8p11.21. O resultado do programa *BLAT* mostrando similaridade ao gene *SFRP1* está apresentado na Figura 12.

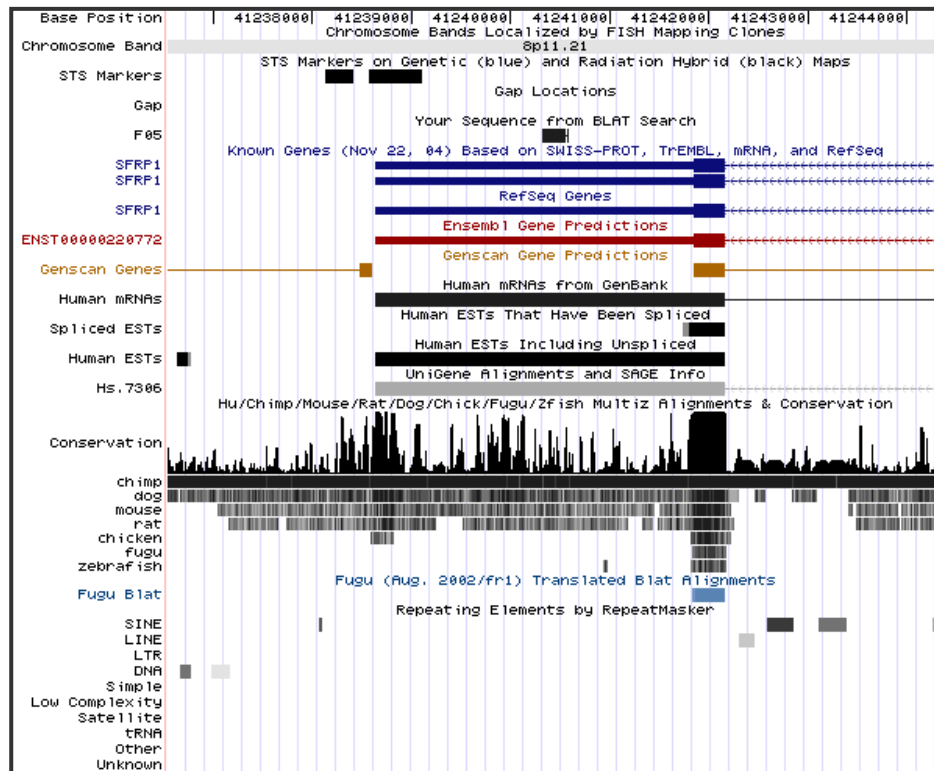
Outro fragmento diferencialmente expresso escolhido para a validação, apresentou similaridade com o gene *CEP63-Centrosome Protein* (símbolo alternativo *FLJ13386*) (*GeneBank Accesion* N° NM_0251800), localizado no cromossomo 3q22.1. Apresentou-se expresso em tumores superficiais (pTaGIII e pT1GIII) pela técnica de *DDRT-PCR* (Figura 11B). A Figura 13 mostra o resultado do programa *BLAT*. O último fragmento escolhido apresentou similaridade com o gene *EIF4G2-Eukariotic Translation Initiation Factor 4* (*GeneBank Accesion* N° NM_00141) e apareceu expresso em tumores superficiais e invasivos (pTaGI,

pTaGIII, pT1GIII e pT2GIII) pela técnica de *DDRT-PCR* (Figura 11C). A Figura 14 mostra o resultado do programa BLAT.



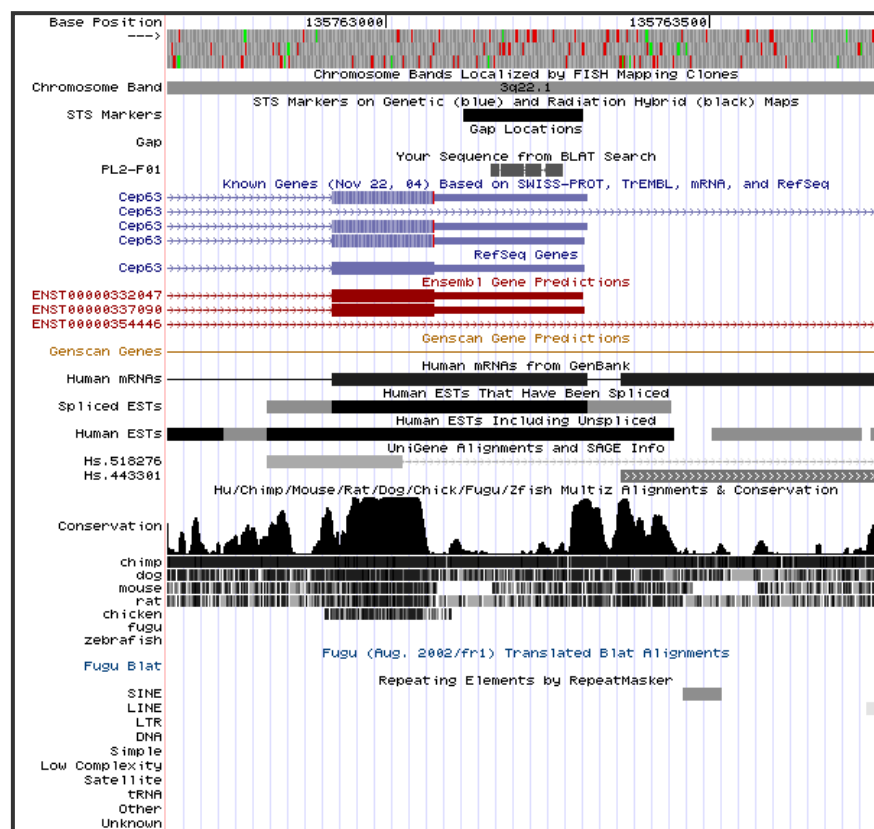
Legenda: A, autorradiograma de onde foi retirado o fragmento que apresentou similaridade ao gene *SFRP1*; B, autorradiograma de onde foi retirado o fragmento que apresentou similaridade ao gene *CEP63*; C, autorradiograma de onde foi retirado o fragmento que apresentou similaridade ao gene *EIF4G2*. As setas indicam os fragmentos recortados. N, tecido normal; Ta-I, tumor Ta grau I; TaIII, tumor Ta grau III, T1, tumor T1 grau III e T2, tumor T2/T4.

Figura 11 - Autorradiogramas representativos das análises de expressão diferencial dos genes através da técnica de *DDRT-PCR*.



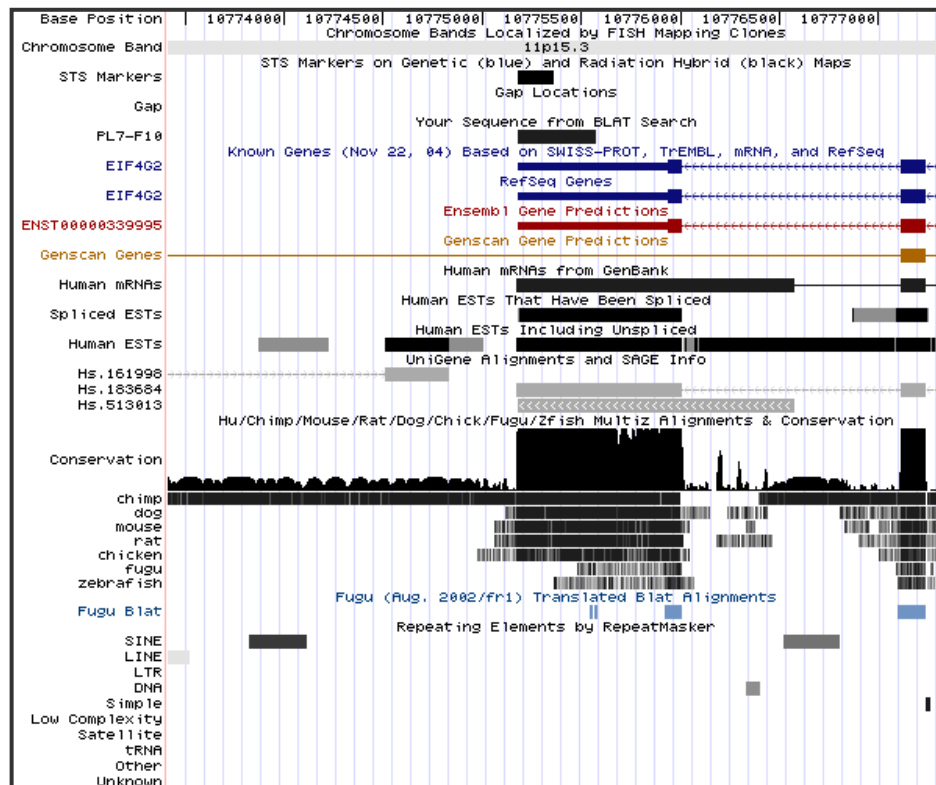
Legenda: O fragmento seqüenciado apresentou similaridade com o gene *SFRP1* na região do cromossomo 8p11.

Figura 12 - Esquema representativo da análise de uma seqüência através do algoritmo *BLAT*.



Legenda: O fragmento seqüenciado apresentou similaridade com o gene *CEP63* na região do cromossomo 3q22.

Figura 13 - Esquema representativo da análise de uma seqüência através do algoritmo *BLAT*.



Legenda: O fragmento sequenciado apresentou similaridade com o gene *EIF4G2* na região do cromossomo 11p15.

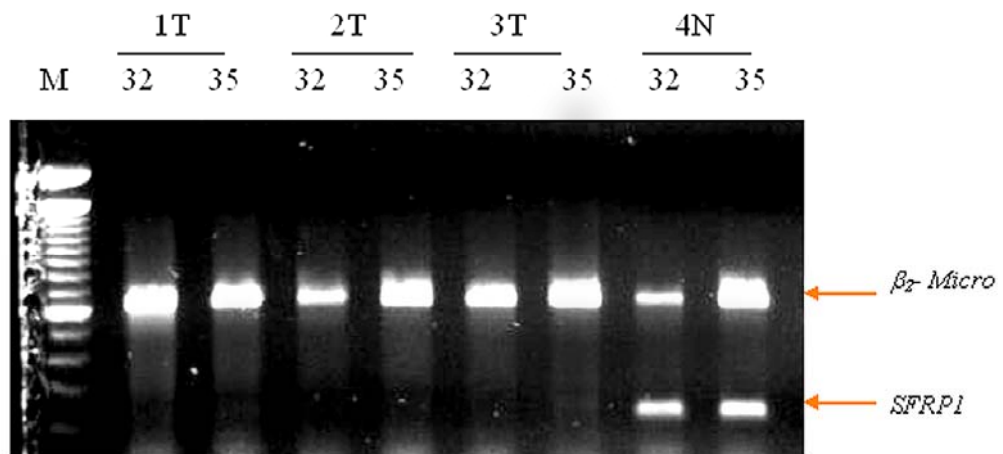
Figura 14 - Esquema representativo da análise de uma seqüência através do algoritmo *BLAT*.

4.4 VALIDAÇÃO DO GENE *SFRP1*

4.4.1 Análise de Expressão de *SFRP1* por *RT-PCR*

A primeira análise de validação do gene *SFRP1* foi feita por *RT-PCR*, em algumas amostras. Para esse ensaio foram desenhados oligonucleotídeos para seqüência expressa de *SFRP1*, nos exons 1 e 3, que amplificam um fragmento de 210pb no cDNA.

Nós observamos através do ensaio de *RT-PCR* que o gene *SFRP1* foi expresso somente no tecido normal, como mostra a Figura 15. Para se confirmar a expressão diferencial do gene *SFRP1* utilizamos a técnica de *Real Time-PCR*, pois é mais precisa que a técnica de *RT-PCR*.



Legenda: T, amostras tumorais; N, amostras de tecido normal; M, marcador de peso molecular 100bp.

Figura 15 - Gel de agarose 2% representativo do ensaio por *RT-PCR* para a amplificação do gene *SFRP1* e β_2 -*Microglobulina* em 32 e 35 ciclos, em amostras de tecido normal e tumoral em pacientes com câncer de bexiga.

4.4.2 Análise da Expressão de *SFRP1* por *Real Time-PCR*

No ensaio por *Real Time-PCR* foram utilizadas 50 amostras de cDNA de CTT. Essas amostras foram divididas em 17 casos de pTaGI, 7 casos de pTaGIII, 11 casos de pT1GIII e 15 casos de pT2/T4GIII e 1 *pool* de tecido normal de bexiga, composta de 8 amostras. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 16.

Para determinar o perfil de expressão do gene *SFRP1* estabelecemos um *cut-off* de 2 vezes em relação a expressão deste transcrito no tecido normal ($\geq 2,0$ para o aumento de expressão e $\leq 0,5$ para a diminuição da expressão e o intervalo de 0,5 a 2,0 para a expressão normal), foi observado diminuição da expressão de *SFRP1* em 45 das 50 amostras de tumor analisadas (90%); a expressão normal foi observada em 4 amostras (8%) e o aumento da expressão foi encontrada em 1 amostra (2%).

A análise de expressão por *RT-PCR* e *Real Time-PCR*, confirmam a expressão diferencial do gene *SFRP1* entre os CTT e o tecido normal de bexiga, validando os resultados obtidos no ensaio de *DDRT-PCR*.

Nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre a expressão de *SFRP1* e idade ou sexo dos pacientes, e o estadiamento do tumor ($p=0,304$, $p=0,809$ e $p=0,234$ respectivamente).

Figura 16 - Gráfico representativo da análise de expressão do gene *SFRP1* em tecido normal e CTT de bexiga por *Real Time-PCR*. A normalização da expressão foi realizada de acordo com a expressão do gene *GAPDH*.

4.4.3 Análise de Metilação do Gene *SFRP1*

Analizamos o *status* de metilação do gene *SFRP1* em 88 amostras de bexiga, sendo 68 amostras de CTT (25 amostras de pTaGI, 12 de pTaG III, 13 de pT1GIII e 18 de pT2/pT4G III) e 20 amostras de tecido normal de pacientes portadores de câncer de bexiga, através da técnica de *Methylation-Sensitive-PCR (MS-PCR)*.

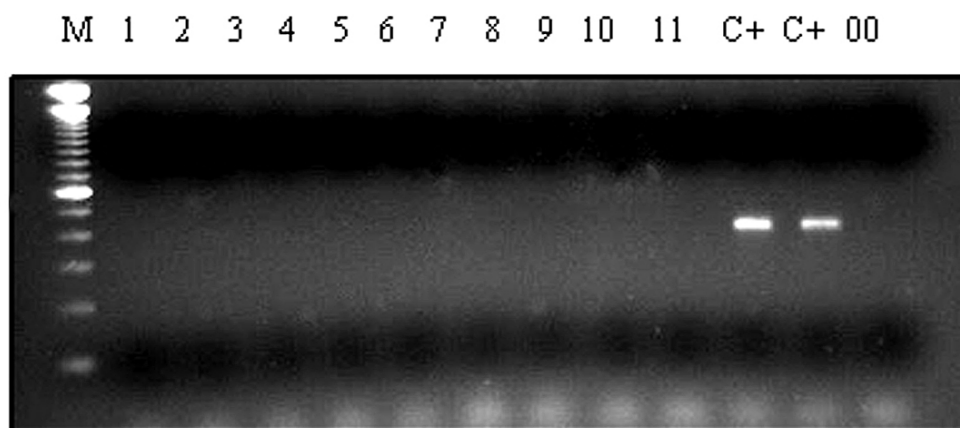
Foram desenhados oligonucleotídeos que flanqueiam parte da região de ilhas CpG, englobando parte do exon 1 e o intron 1 do gene *SFRP1*. As ilhas CpG desse gene foram identificadas através do programa *BLAT*.

As amostras foram submetidas à digestão com as enzimas sensíveis a metilação (*HpaII* e *MspI*). Essas enzimas apresentam o mesmo sítio de restrição (CCGG), entretanto, a enzima de restrição *HpaII* não digere o DNA se a citosina localizada a 5' da guanina estiver metilada (CC^MGG), já a enzima *MspI* é insensível ao *status* de metilação do DNA. Depois que os DNAs foram submetidos a digestão pelas enzimas foi realizada reação de *PCR* utilizando-se oligonucleotídeos para o gene *HIC*, para verificar se houve digestão completa do DNA. Os oligonucleotídeos para esse gene flanqueiam região que contém sítios de restrição para as enzimas *HpaII* e *MspI*, desse modo se houver digestão completa do DNA não deverá aparecer produto amplificado (Figura 17). Para verificar a massa do DNA após a digestão foi realizada amplificação por *PCR* utilizando-se os oligonucleotídeos que amplificam o exon 6 do gene *TP53* e não contem sítios de restrição para as enzimas *HpaII* e *MspI* (Figura 18).

As amostras de DNA submetidas à digestão com as enzimas *HpaII* e *MspI* foram amplificadas utilizando-se oligonucleotídeos para o gene *SFRP1*, para verificar se a região promotora deste gene encontrava-se metilada (Figura 18).

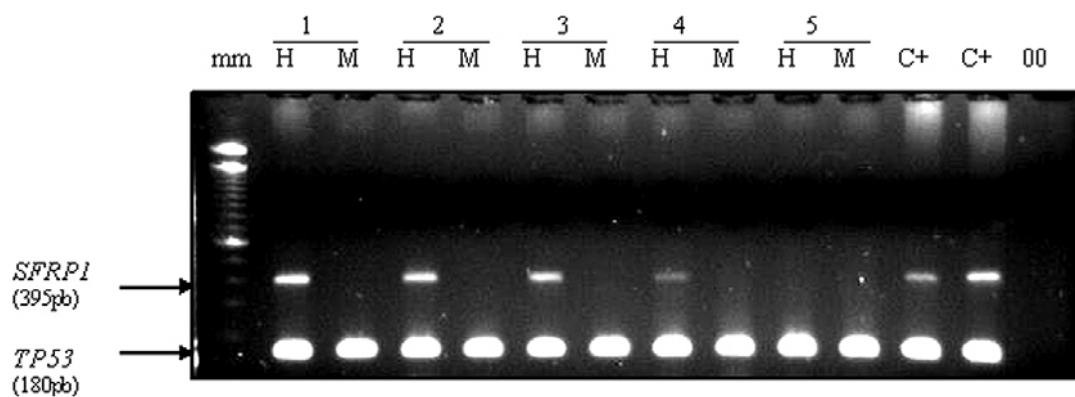
Na análise das 68 amostras de tumor, foi verificado que 23,5% delas (16/65) apresentaram a região de ilhas CPG do gene *SFRP1* metilada. A frequência de metilação no tecido normal foi de 5% (1/20), nos tumores superficiais pTaGI a frequência foi de 16% (4/25) e nos pTaGIII foi de 8,3% (1/12), nos tumores pT1GIII foi de 23% (3/13) e nos tumores invasivos pT2/pT4GIII foi de 44% (8/18). Figura 19 mostra a distribuição da frequência do *status* de metilação da região promotora do gene *SFRP1*.

Frente aos resultados de frequência de metilação apresentado pelo gene *SFRP1* nas amostras tumorais e no tecido normal dos 68 pacientes, foi realizada a associação da presença de metilação na região promotora com os parâmetros clínicos-patológicos e demográficos desses pacientes (Tabela 5). A metilação na região promotora do gene *SFRP1* mostrou uma associação no limite da significância entre tecido normal e tumoral ($p=0,055$). A metilação na região promotora do gene *SFRP1* mostrou uma associação estatisticamente significativa entre os tumores invasivos pT2/pT4GIII quando comparados com os tumores superficiais pTa (GI e GIII) ($p=0,016$), e com os tumores superficiais pTaGI, pTaGIII e pT1GIII ($p=0,020$). Não foi observada associação entre os tumores pT2/pT4GIII comparados apenas com os tumores pT1GIII e o *status* de metilação do gene *SFRP1* ($p=0,20$), também não foi encontrada associação entre os graus histológicos e a frequência de metilação de *SFRP1* ($p=0,208$). Nenhuma associação foi observada entre o *status* de metilação na região promotora do gene *SFRP1* e idade e sexo e ($p=0,352$ e $p=0,514$ respectivamente) (Tabela 5).



Legenda: A ausência de bandas nas amostras indica que o DNA foi completamente digerido. C +, controles positivos, ou seja, DNA que não foi submetido à digestão; 00, controle negativo, isto é sem DNA; M, marcador de peso molecular 100bp.

Figura 17 - Gel de agarose 2% representativo das amplificações por *PCR* com os oligonucleotídeos do gene *HIC* para verificar a digestão com a enzima *HpaII*.



Legenda: H, DNA submetidos à digestão com a enzima *HpaII*; M, DNA submetidos a digestão com *MspI*. As amostras 1, 2, 3 e 4 submetidas a digestão por *HpaII* apresentam amplificação do fragmento 395pb e encontram-se metiladas, a amostra 5 que não apresentou amplificação do fragmento não está metilada. A amplificação do fragmento do gene *TP53* foi utilizada como controle de massa. C +, controle positivos, ou seja, DNA sem digestão; 00, controle negativo, reação sem o DNA; mm, marcador de peso molecular 100bp.

Figura 18 - Gel de agarose 2% representativo da análise de metilação do gene *SFRP1* em CTT de bexiga.

Tabela 5 - Associação da metilação do gene *SFRP1* com os parâmetros histopatológicos e demográficos.

Variável	Número de amostras	<i>SFRP-1</i>		P (teste χ^2)
		Não Metilado N (%)	Metilado N (%)	
Tecido normal	20	19 (95)	1 (5,0)	0,055
Carcinomas	68	52 (76,5)	16 (23,5)	
Estádios patológicos				
pTaGI/pTaGIII	37	32 (86)	05 (14)	0,016
pT2/pT4GIII	18	10 (56)	08 (44)	
Estádios patológicos				
pTaGI/pTaGIII/pTG1	50	42 (84)	08 (16)	0,020
pT2/pT4GIII	18	10 (56)	08 (44)	
Estádios patológicos				
pT1GIII	13	10 (77)	03 (23)	0,200
pT2/pT4GIII	18	10 (56)	08 (44)	
Grau histológico				
Baixo grau (GI)	25	21 (84)	04 (16)	0,208
Alto grau (GIII)	43	31 (72)	12 (28)	
Sexo				
Masculino	51	40 (78)	11 (22)	0,514
Feminino	17	14 (82)	03 (18)	
Idade				
≥ 60	48	37 (77)	11 (23)	0,352
< 60	20	17 (85)	03 (15)	

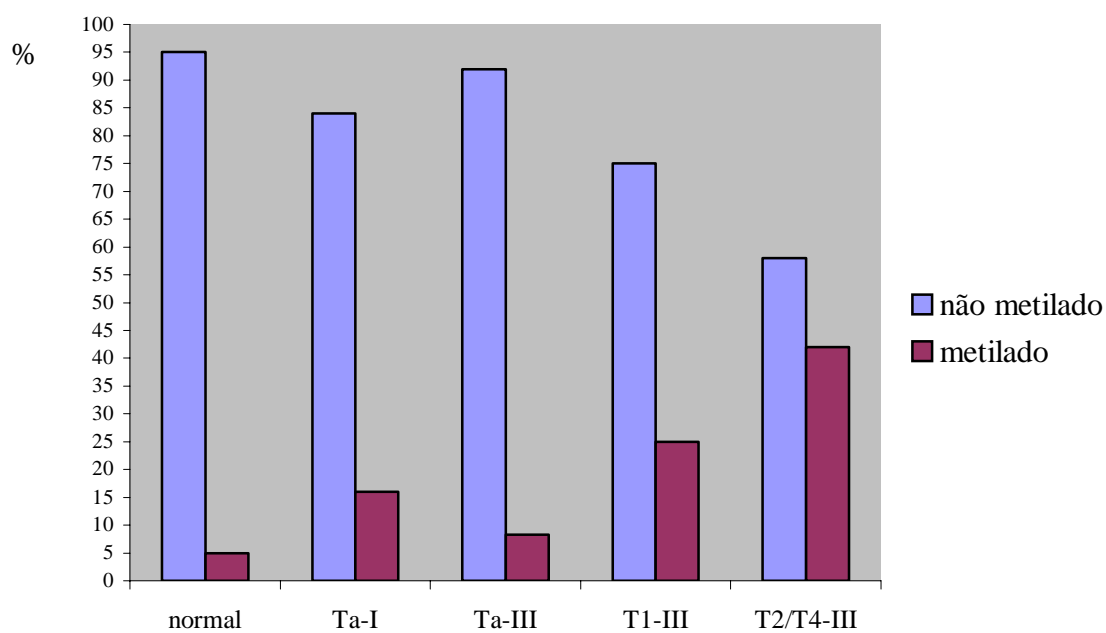


Figura 19 - Distribuição da frequência de metilação na região promotora do gene *SFRP1* entre as amostras de tecido normal e os carcinomas de células transicionais de bexiga.

4.4.4 Análise de Expressão Versus Análise de Metilação do Gene *SFRP1*

Na análise de associação entre o *status* de metilação na região do promotor e expressão do RNAm de *SFRP1*, não encontramos associação significativa ($p=0,08$). Entretanto, entre os 14 tumores que foram analisados por *Real Time-PCR* e que apresentaram metilação na região do promotor, observamos que 11 tumores (79%) apresentaram reduzida expressão de *SFRP1* (*cut-off* de 2,0 em relação à expressão desse transcrito no tecido normal). Em 2 amostras que apresentou metilação na região promotora não foi possível a análise por *Real Time-PCR*.

A Figura 20 mostra um gráfico representativo das amostras que apresentaram metilação na região promotora e da análise de expressão do gene *SFRP1*.

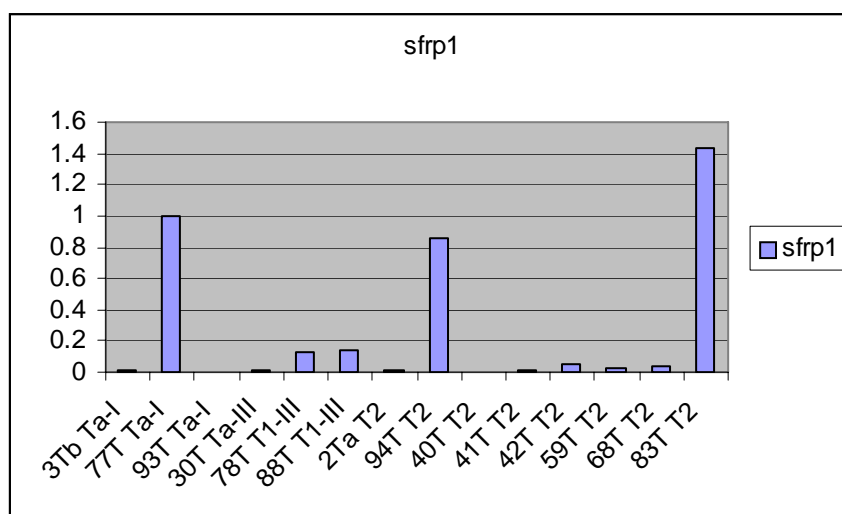


Figura 20 - Gráfico representativo das amostras que apresentaram metilação na região promotora e da análise de expressão do gene *SFRP1*.

4.5 VALIDAÇÃO DOS GENES *EIF4G2* E *CEP63*

4.5.1 Análise de Expressão dos Genes *EIF4G2* e *CEP63* por *Real Time-PCR*

Para o ensaio de *Real Time-PCR* foram desenhados oligonucleotídeos para a seqüência dos genes *EIF4G2* e *CEP63* depositada no *GeneBank*. Os oligonucleotídeos para o gene *EIF4G2* foram desenhados para os exons 4 e 5 e amplificam um fragmento de 150pb no cDNA. Para o gene *CEP63* foram desenhados oligonucleotídeos para os exons 14 e 15 e amplificam no cDNA um fragmento de 198pb. Antes de realizar as análises por *Real Time-PCR* foi realizado um ensaio de *RT-PCR* em algumas amostras para padronizar as condições da reação. A Figura 21 mostra o resultado desse ensaio.

A análise de expressão dos transcritos do gene *EIF4G2* foi realizada utilizando-se cDNAs proveniente de 50 CTT (17 casos de pTaGI, 7 casos de pTaGIII, 11 casos de pT1GIII e 15 casos de pT2/pT4GIII) e 1 *pool* de tecido normal, composto por 8 amostras (Figura 22). A expressão do gene *CEP63* foi analisada em 48 CTT (16 casos de pTaGI, 7 casos de pTaGIII, 11 casos de pT1GIII e 14 casos de pT2/pT4GIII) e 1 *pool* de tecido normal, composto por 8 amostras (Figura 23).

Para determinar o perfil de expressão dos transcritos dos genes *EIF4G2* e *CEP63* estabelecemos o *cut-off* de 2 vezes em relação a expressão desses transcritos no tecido normal ($\geq 2,0$ para aumento de expressão e $\leq 0,5$ para diminuição de expressão). Das 50 amostras de tumores analisadas para expressão do gene *EIF4G2*, 25 (50%) apresentaram redução de expressão, 20 (40%) apresentaram expressão normal e 5 (10%) apresentaram aumento de expressão (Figura 22).

Diferente do observado pela técnica de *DDRT-PCR*, onde o gene *EIF4G2* foi expresso com maior intensidade nos *pools* de tumores pTaGI, pTaGIII e pT1GIII e com menor intensidade no *pool* de tumores pT2/pT4GIII (Figura 11C), pela técnica de *Real Time-PCR* a maioria das amostras apresentou expressão reduzida deste gene.

Não encontramos associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de *EIF4G2* e sexo ou idade dos pacientes ($p=0,636$ e $p=0,243$, respectivamente). Observamos uma associação significativa entre a diminuição da expressão de *EIF4G2* e o estadiamento tumoral ($p=0,022$).

Na análise de expressão do gene *CEP63*, observamos que das 48 amostras de tumor analisadas, 25 (52%) apresentaram expressão reduzida, 19 (40%) tiveram expressão normal e 4 (8,3%) apresentaram aumento de expressão.

A expressão reduzida de *CEP63* foi encontrada na maioria dos tumores analisados, em todos os estadios tumorais, e o aumento da expressão foi observada em 14% (2/14) dos tumores pT2/pT4GIII, em 6% (1/16) dos tumores pTaGI e em 14% (1/7) dos tumores pTaGIII. Entretanto, no ensaio de *DDRT-PCR* o gene *CEP63* foi expresso nos *pools* de tumores pTaGIII e pT1GIII.

Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre os níveis de expressão do gene *CEP63* e as características dos pacientes como, sexo, idade e o estadiamento tumoral ($p=0,467$, $p=0,350$ e $p=0,09$, respectivamente).



Figura 21 - Gel de agarose 2% representativo do ensaio por *RT-PCR* para a amplificação do gene *EIF4G2* e do gene *CEP63*, em amostras de tecido de bexiga. M, marcador de peso molecular 100bp.

Figura 22 - Gráfico representativo da análise de expressão do gene *EIF4G2* em tecido normal e CTT de bexiga por *Real Time-PCR*. A normalização da expressão foi realizada de acordo com a expressão do gene *GAPDH*

Figura 23 - Gráfico representativo da análise de expressão do gene *CEP63* em tecido normal e CTT de bexiga por *Real Time-PCR*. A normalização da expressão foi realizada de acordo com a expressão do gene *GAPDH*.

5 DISCUSSÃO

O câncer de bexiga é uma das neoplasias urológicas mais freqüentes em países desenvolvidos e a maioria é do tipo carcinoma de células transicionais (CTT). Os CTT são caracterizados em tumores superficiais e invasivos. Aproximadamente 80% dos tumores de bexiga são superficiais. Os pacientes portadores desses tumores apresentam recidivas em torno de 50 a 80% dos casos, e podem progredir para invasivos em 10 a 20% dos casos. Os tumores invasivos são potencialmente letais e 50% dos pacientes apresentam metástase dentro de 2 anos (KNOWLES 2001; WILLIAMS et al. 2001).

Até o momento, nenhum marcador pode prever o comportamento dos tumores de bexiga. Existe grande necessidade de identificar marcadores moleculares que possam ser incorporados à prática clínica para adicionar informações para o prognóstico e diagnóstico dos CTT de bexiga. A identificação dos indivíduos cujo câncer de bexiga não progredirá daqueles em que o câncer será potencialmente letal, poderá ser útil no tratamento da doença, podendo ser aplicadas terapias mais adequadas a cada paciente.

Neste estudo, utilizamos a técnica de *Differential Display-Reverse Transcriptase-PCR (DDRT-PCR)* a fim de identificarmos genes diferencialmente expressos nos tecidos normais e CTT de bexiga. A técnica de *DDRT-PCR* foi escolhida por ser de fácil execução e também por utilizar pequenas quantidades de RNA.

Em nosso trabalho observamos a existência de diversos fragmentos de cDNA diferencialmente expressos, que apresentaram similaridade a genes conhecidos, proteínas hipotéticas e *EST*. Os transcritos que apresentaram similaridade a genes conhecidos estão relacionados a diferentes vias biológicas, como: processamento de RNA, transporte de elétrons, regulação da transcrição, início de tradução, resposta imune, transdução de sinal, atividade motora, ligação a íons, biosíntese de nucleotídeos, metabolismo de esteróis, síntese de proteína, divisão celular, adesão celular, regulação do ciclo celular, entre outros.

Alguns transcritos identificados neste estudo foram também identificados em outros trabalhos, sendo que alguns deles foram relacionados à outros cânceres e alguns foram associados ao câncer de bexiga.

O gene *NDRG1* (*N-myc downstream–regulated gene 1*), localizado na região do cromossomo 8q24.22, foi identificado em tumor de próstata como candidato a supressor de metástase. A sua expressão foi inversamente correlacionada com a graduação de Gleason, e também observaram a sua expressão reduzida em pacientes com metástase (BANDYOPADHYAY et al. 2003). O gene *NDRG1* também foi identificado como supressor de metástase em câncer de cólon (GUAN et al. 2000). Entretanto, em tumor coloretal parece ser um provável gene promotor de metástase (WANG et al. 2004). Esse gene foi identificado em nosso estudo expresso em tumores superficiais (pTaGI, pTaGIII e pT1GIII) e em tumores invasivos (pT2GIII). Não se tem relato sobre esse gene em tumor de bexiga,

O gene *UBA52* (*Ubiquitin and ribosomal protein L40*) está localizado na região do cromossomo 19p13, apresenta atividade proteolítica. Em nosso trabalho foi encontrado expresso em Ta grau I por *DDRT-PCR*. Não existem dados na literatura

sobre esse gene em tumor de bexiga, mas foi encontrado super expresso em câncer de cólon e renal (KANAYAMA et al. 1991; BARNARD et al. 1995).

O gene *COX6C* (*Cytochrome C oxidase subunit VIC*), mapeado na região do cromossômo 8q22.2, está relacionado a cadeia respiratória. Em nosso trabalho foi expresso em todos os tumores superficiais. WANG et al. (1996) também identificaram esse gene, pela técnica de *DDRT-PCR*, com aumento de expressão em câncer de próstata. Os autores confirmaram a expressão diferencial por *Northern Blot*, e observaram que em tecido tumoral de próstata a sua expressão foi aumentada em relação ao tecido normal.

O gene *EGR1* (*Early Growth Response 1*), age como fator de transcrição e foi relatado ter expressão do transcrito diminuída em leiomiomas quando comparado com o tecido normal (SHOZU et al. 2004). Em tumor de esôfago e próstata, esse gene apresentou aumento de expressão (MY et al. 2004; ADAMSON et al. 2003). Em nosso estudo, o gene *EGR1* foi identificado em pTaGI, pTaGIII e pT1GIII. Não se tem relato desse gene em tumor de bexiga.

O gene Catalase está localizado na região cromossômica 11p14, tem atividade oxidoreductase e foi identificado em nosso estudo expresso em tumores superficiais pTaGIII e pT1GIII. DURAK et al. (1994) observaram o aumento da atividade da Catalase em câncer de bexiga quando comparado com tecido adjacente sem tumor e com tecido de bexiga de pessoas sadias.

O gene *MSH3* é um gene de reparo de DNA e está localizado na região cromossômica 5q14.1, em nosso trabalho foi identificado expresso em tecido normal e em todos os tumores superficiais. VAISH et al. (2003) não observaram instabilidade de microsatélite de *MSH3* em tumores de bexiga. Mas o oposto foi

mostrado por KAWAKAMI et al. (2004) que observaram que a expressão de *MSH3* foi reduzida em tumor de bexiga quando comparado com o tecido normal. THYKJAER et al. (2001), sugeriram que a expressão alterada em genes de reparo, entre eles o gene *MSH3*, pode levar a perda da atividade de reparo no DNA e que pode estar associado ao processo de invasão do câncer de bexiga.

O gene *HPGD* (*Hydroxy prostaglandin dehydrogenase*) foi expresso pela técnica de *DDRT-PCR* em tumor pTaGI. GEE et al. (2003) observaram a expressão reduzida de *HPGD* em tumor de bexiga com estádios avançados e com alto grau de malignidade. CELIS et al. (1996) analisando o perfil de expressão de proteínas no urotélio normal da bexiga e em CTT observaram que a proteína *HPGD* foi expressa em tecido normal e foi diminuída em CTT em vários estádios de progressão.

Dos 74 transcritos identificados neste trabalho, predominaram transcritos que apresentaram similaridade a regiões dos cromossomos 1, 3, 8, 11 e 5.

Estudos citogenéticos demonstraram que cerca de 35% dos cânceres de bexiga tem aberrações envolvendo o cromossomo 1, estas incluem deleções, translocações e duplicações (GIBAS e GIBAS 1997). O cromossomo 1 apresenta alguns loci que foram associados ao tumor de bexiga (1p36 - *TP73*; 1q23-24 - *KIAA1096*; 1p32 - *L-myc*) (SENGELOV et al. 2000; HUANG et al. 2002; MATSUMOTO et al. 2004). Também foi associado ao tumor de bexiga, ganho do braço longo do cromossomo 1 (ZHAO et al. 1999; HOGLUND et al. 2001). Em nosso estudo, no cromossomo 1 foram identificados 5 fragmentos de cDNA localizados na região do braço longo do cromossomo e 6 fragmentos no braço curto. Um transcrito apresentou similaridade a EST, que foi encontrado expresso em tecido normal, pTaGI, pTaGIII e pT1GIII e pode representar um novo gene. Dois

transcritos expressos em todos os tumores apresentaram similaridade com a proteína hipotética *KIAA1573* e *FLJ13456*. Os outros transcritos apresentaram similaridade a genes conhecidos, como o *TFCP14*, expresso em pTaGI, pTaGIII e pT1GIII, e está relacionado ao fator de transcrição; *UMP-CMPK*, expresso em tumor pTaGI, que tem atividade kinase; o *PHF13*, que é um regulador da transcrição, foi encontrado em tecido normal e em tumores superficiais.

O cromossomo 3 apresenta vários loci associados ao tumor de bexiga (FHIT-3p14.2; RAF1 – 3p25; RASSF1A – 3p21.3; p63 – 3q27-29) (BAFFA et al. 2000; SIMON et al. 2001; URIST et al. 2002; CHAN et al. 2003). A perda do cromossomo 3 também tem sido associadas a progressão do tumor de bexiga. Neste estudo foram identificados 5 fragmentos de cDNA com similaridade a região do braço longo do cromossomo 3, e 1 cDNA com similaridade ao braço curto. Dois desses fragmentos apresentaram similaridade a EST e ao gene *Plastin 1*, ambos expressos por *DDRT-PCR* em tumores superficiais pTaGI, pTaGIII e pT1GIII. Os outros apresentaram similaridade a genes conhecidos, como o *CEP63* expresso em pTaGIII e pT1GIII; o gene *Latexin* expresso em pTaGI e pT2GIII e os genes *CGGBP1* e *MFSD1* expressos em pTaGI.

Alguns genes candidatos a participarem da tumorigenese de bexiga têm sido identificados no cromossomo 8. Na região do cromossomo 8p22 encontra-se o gene *FEZ1/LZTS1* que apresentou expressão reduzida em tumor de bexiga (VECCHIONE et al. 2002). Amplificações nas regiões do cromossomo 8p12 (*FGFR1*) e 8p22.2 (*C-myc*) também foram relacionadas ao tumor de bexiga (SIMON et al. 2001; VELTMAN et al. 2003). Frequentes deleções em 8p e também ganho em 8q tem sido identificadas em tumor de bexiga (HOGLUND et al. 2001; PRAT et al. 2001).

Em nosso estudo foram identificados 6 transcritos com similaridade a região do cromossomo 8q. Desses, três estão localizados nas regiões dos cromossomos 8q21, 8q22 e 8q24, sugerindo que alterações nessas regiões podem estar relacionadas ao câncer de bexiga. Na região do cromossomo 8q21.11 foi identificado em nosso trabalho, o gene *PMXP3*, expresso em tecido normal e em tumores superficiais; na região cromossômica 8q21.3, está localizado o gene *RIPK2*, expresso em pTaGI; no região 8q21.11, foi encontrado a proteína hipotética *FLJ20533* expressa em tecido normal; em 8q12.1 e 8q22.2 foram identificados os genes *RPS20* e *COX6C* ambos expressos em tumores superficiais e na região 8q24.22 foi encontrado o gene *NDRG1* expresso em todos os tumores.

A fim de confirmarmos a expressão diferencial, os genes *SFRP1*, *CEP63* (*FLJ13386*) e *EIF4G2* foram selecionados para os ensaios de validação, em um número maior de amostras.

O gene *SFRP1* (*Secreted Frizzled Related Protein 1*), mapeado na região do cromossomo 8p12-p11, é um dos cinco membros da família de proteínas secretoras (SFRP). O gene *SFRP1* codifica uma proteína de aproximadamente 300 aminoácidos que contem um domínio N-terminal rico em cisteína (CRD) que é similar em aproximadamente 30–50% ao domínio das proteínas transmembrânicas da família Frizzled que atuam como receptoras da proteína Wnt. (FINCH et al. 1997; BAFICO et al. 1999, UREN et al.2000). A proteína SFRP1 age como moduladora bifásica da via de sinalização do Wnt, promovendo um efeito de indução ou de bloqueio da via do Wnt (BAFICO et al. 1999).

As moléculas que sinalizam o meio extracelular têm essencial papel como indutoras da proliferação celular, migração, diferenciação e no desenvolvimento

normal da morfogênese do tecido. Elas também podem participar do crescimento anormal das células associado com a neoplasia. Entre as moléculas envolvidas nesta atividade temos a Wnt. Os genes *WNT* codificam uma família de glicoproteínas secretoras que sinalizam a regulação da proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário. Em vertebrados, esta família consiste em mais de uma dúzia de moléculas, que contêm 350–380 resíduos de aminoácidos, e incluem 23–24 resíduos de cisteína bem conservados durante a evolução (FINCH et al. 1997).

A proteína Wnt induz a sinalização intracelular se ligando ao seu receptor Frizzled, localizado na membrana celular (BHANOT et al. 1996). Os genes Frizzled codificam proteínas de membrana com grande porção extracelular que contem domínio rico em cisteína (CRD), que é o provável sítio de ligação para Wnt e também contem 7 prováveis domínios transmembrânicos e uma cauda citoplasmática (FINCH et al. 1997; UREN et al. 2000).

A interação entre a proteína Wnt e o seu receptor *Frizzled*, ativa uma cascata de múltiplos passos, agindo através da proteína citoplasmática *Dishevelled* para inibir a atividade do complexo APC (*Adenomatous poliposi coli*), a *GSK-3 β* (*Glicogen syntase kinase 3 β*) e *Axin*, resultando na diminuição da fosforilação da β -catenina, o que a torna menos propícia a degradação por proteosomas, levando o seu acúmulo no citosol. Subseqüentemente, a β -catenina pode translocar para o núcleo e formar um complexo com o fator de crescimento de linfócitos (*LEF*) e o fator de células T (*TCF*) ativando a transcrição de muitos genes relacionados à proliferação celular, como *C-myc*, *Ciclina D1* e metaloproteínases que podem promover a proliferação e predispor a transformação maligna (UREN et al.2000; CHEN et al. 2001).

A proteína SFRP1 interfere na sinalização do Wnt, se ligando diretamente a proteína Wnt e impedindo que ela se ligue ao receptor *frizzled* ou, alternativamente, a proteína SFRP1 pode formar um complexo com o receptor *frizzled*, através do domínio CRD, bloqueando a sinalização do Wnt (BAFICO et al. 1999).

A baixa concentração de SFRP1 pode aumentar a atividade da via de sinalização do Wnt (UREN et al. 2000; SUZUKI et al. 2002; CALDWELL et al. 2004), já a super regulação do SFRP1 pode inibir a via de sinalização do Wnt e tem sido associada com o aumento de apoptose (MELKONYAN et al. 1997, ZHOU et al. 1998).

Existem evidências que alterações na sinalização do Wnt podem contribuir para processos neoplásicos. Muitos membros da via do Wnt estão implicados na carcinogênese. Alterações genéticas afetando os genes *APC* e *β -catenina*, associadas ao acúmulo da β -catenina, têm sido observadas em câncer de cólon, melanoma, carcinoma hepatocelular, indicando que alterações na sinalização do Wnt são críticas no desenvolvimento desses cânceres e possivelmente de outros (FUKUHARA et al. 2002; UGOLINI et al. 2001).

O envolvimento de *SFRP1* nos processos de apoptose e na regulação do crescimento celular indica que este gene pode contribuir para a proliferação celular descontrolada levando a tumorigênese (ZHOU et al. 1998). Recente estudo mostrou que *SFRP1* é inativado por metilação na região promotora em câncer de ovário (TAKADA et al. 2004). A hipermetilação da região promotora de *SFRP1* também foi encontrada em carcinoma coloretal (SUZUKI et al. 2002; SUZUKI et al. 2004). CALDWELL et al. (2004) também mostraram aumento da metilação deste gene que foi associado com a redução do transcrito de *SFRP1* em carcinoma coloretal. A

redução da expressão de *SFRP1* foi observada em carcinoma de mama (UGOLINI et al. 2001; WONG et al. 2002). ZHOU et al. (1998) demonstraram o envolvimento de *SFRP1* em câncer de mama, quando observaram que o *SFRP1* não foi expresso em 5 linhagens de carcinoma de mama, mas foi expresso em linhagem de células não malignas de mama. Em mesotelioma pleural maligno, o gene *SFRP1* é freqüentemente metilado e apresenta baixa expressão (LEE et al. 2004).

No ensaio de *DDRT-PCR*, o gene *SFRP1* foi expresso no tecido normal. Foi realizada análise de expressão desse gene por *RT-PCR* e *Real Time-PCR*. O gene *SFRP1* apresentou diminuição da expressão em 90% das amostras tumorais, confirmando o resultado obtido no ensaio de *DDRT-PCR*. Nossos resultados corroboram os resultados obtidos por STOEHR et al. (2004) que também demonstraram a perda de expressão do gene e da proteína SFRP1 em tumores de bexiga, e associaram a perda de expressão com alto grau tumoral e estadios avançados.

O mecanismo que leva a baixa regulação da expressão de *SFRP1* não é totalmente entendido. Para determinar a razão da perda de expressão de *SFRP1* associada com os CTT de bexiga, nós examinamos o *status* de metilação do promotor desse gene.

Em nosso estudo, análise da metilação da região promotora de *SFRP1* mostrou que 23% dos casos apresentaram metilação e apenas 5% do tecido normal apresentaram metilação. A metilação da região promotora de *SFRP1* foi associada com a progressão do tumor. Nossos dados estão de acordo com o estudo realizado por STOEHR et al. (2004), que observaram que em 29% dos casos o gene *SFRP1* apresentava a região promotora metilada.

O *status* de metilação da região promotora de um gene está correlacionado com a sua expressão. Em geral, quando o DNA apresenta metilação na região promotora, observa-se uma redução na expressão gênica. Observamos que na maioria das amostras que apresentaram metilação na região promotora também apresentaram baixa expressão do transcrito de *SFRP1*. Os dados desse trabalho sugerem que eventos epigenéticos podem ser uma das causas para a perda de expressão do gene *SFRP1* em tumor de bexiga. Entretanto, em amostras de tumor de bexiga que não apresentaram metilação na região promotora mais que mostraram baixa regulação da expressão, sugerem que outros mecanismos possam estar envolvidos no silenciamento do gene *SFRP1*, como por exemplo, a perda de heterozigose na região do cromossomo 8p12.

Considerando-se o papel da proteína SFRP1 como moduladora da via de sinalização do Wnt, a diminuição da expressão do gene *SFRP1* pode estar aumentando a atividade de Wnt e ativando a transcrição de genes relacionados à proliferação celular, podendo estar contribuindo para a progressão dos tumores de bexiga. Os dados desse trabalho sugerem que o gene *SFRP1* pode ser um importante marcador para os tumores de CTT de bexiga.

A proteína hipotética *FLJ1338* foi recentemente caracterizada como proteína de centrômero *CEP63* (*Centrosome protein 63*) e está localizada no cromossomo 3q22.1 (ANDERSEN et al. 2003).

A perda da integridade do cromossomo, bem como a alterações no centrômero estão relacionados ao processo de tumorigênese. Uma variedade de aberrações cromossômicas como, a ploidia anormal, que é causada pela não segregação dos cromossomos é comuns em câncer. O centrômero tem papel crucial

na manutenção da estabilidade genética por estabelecer a polaridade dos fusos mitóticos durante a divisão celular e o mau funcionamento das proteínas de centrômero em geral, pode contribuir para a progressão do câncer (SAUNDERS et al. 2000; TAKAHASHI et al. 2000).

Não existem dados na literatura sobre a proteína de centrômero Cep63 ou seu envolvimento em cânceres. Entretanto, algumas proteínas de centrômero foram associadas com a progressão dos tumores. O gene *STK15/BTAK*, que codifica kinase mitóticas e tem sido implicado na regulação da duplicação o centrômero, foi encontrado amplificado e com aumento de expressão em tumores humanos, sugerindo que a proteína *STK15* pode representar um componente crítico na segregação dos cromossomos, podendo causar aneuploidias e transformações malignas (SEN et al. 2002). A amplificação e o aumento da expressão de *STK15* foi associado com aneuploidia e comportamento agressivo em tumores de bexiga (SEN et al. 2002). Em tumores de mama e coloretal também foi observado o gene *STK15* super expressado (TAKAHASHI et al. 2000; MIYOSHI et al. 2001).

Outra proteína de centrômero envolvida na carcinogênese é a *Nek2*, uma kinase de centrômero que age na separação dos centrômeros e na formação do fuso mitótico. Essa proteína foi encontrada super regulada em carcinoma de mama (HAYARD et al. 2004).

Neste trabalho observamos, pela técnica de *Real Time-PCR*, alterações no padrão de expressão do gene *CEP63* em tecido tumoral em relação ao tecido normal. A maior parte dos tumores analisados apresentou redução na expressão desse gene e apenas uma pequena parcela dos tumores apresentou aumento de expressão. Observamos uma tendência na diminuição de expressão em tumores com alto grau

estádios avançados, o que mostra uma discordância entre os resultados obtidos nos ensaio de *Real Time-PCR* e *DDRT-PCR*. Apesar do padrão de expressão desse gene ter sido heterogêneo, não podemos descartar a hipótese de que aumento ou diminuição da expressão possam estar envolvidos no CTT de bexiga. Novos estudos são necessários para comprovar o envolvimento desse gene na tumorigênese de bexiga.

O gene *EIF4G2* (*Eucaryotic Translation Initiation Factor 4-Gamma*), está localizado na região do cromossomo 11p15 e participa do início da tradução do RNAm.

Os RNAm eucarióticos sofrem modificações depois da sua transcrição. Uma dessas modificações consiste na adição da estrutura cap, composta de 7-metilguanossina ligada a trifosfato no final 5' do RNAm. A estrutura cap tem papel importante para facilitar a ligação do ribossomo ao final 5' do RNAm, para iniciar a tradução. O início da tradução é mediado pelo reconhecimento da estrutura cap por *EIF4F* (*Eukariotic translation initiation factor 4F*), um complexo de ligação ao cap. O complexo *EIF4F*, é composto por 3 subunidades: *EIF4E*, proteína que se liga a estrutura cap; *EIF4A* uma RNA helicase e *EIF4G*. A *EIF4G* apresenta na região N-terminal um sítio de ligação para a proteína *EIF4E* e na região C-terminal um sítios de ligação para a *EIF4A*, e também interagem com a *eiF3* associada a subunidade ribossomal 40S. Assim, *EIF4G* funciona como ponte de ligação entre o ribossomo e o RNAm (GRADI et al. 1998; PYRONMET et al. 2001)

Em muitos tumores, a síntese de proteína e a expressão de componentes relacionados a tradução são significativamente mais elevados, sugerindo a importância do controle da tradução na progressão dos tumores. Estudos prévios têm

fornecido evidências que a super expressão dos componentes do fator de tradução pode ter papel importante no processo da carcinogênese (CLEMENS 2004). A maioria tem documentado a super expressão de *EIF4E* em vários tumores, incluindo tumor de cólon, linfomas, cabeça e pescoço, mama, pulmão, próstata, tireóide entre outros (SORRELLS 1998; ROSENWALD et al. 1999; BERKEL et al. 2001; DE BENEDETTI e GRAFF 2004; WANG 2001). Em tumor de bexiga, elevada expressão de *EIF4E* foi observada em relação ao tecido normal (CREW et al. 2000). Além disso, a expressão de *EIF4E* foi associada com o aumento de expressão do gene *VEGF* (CREW et al. 2000).

Alguns estudos também sugerem que a super expressão de *EIF4G* pode estar relacionada com o fenótipo maligno. Foi descrito que a super expressão de *EIF4G1*, que é similar em estrutura e função ao *EIF4G2*, causou transformação maligna em fibroblasto de camundongo (FUKUCHI-SHIMOGORI et al. 1997). Em carcinoma de células escamosas de pulmão foi observado aumento de expressão e amplificação de *EIF4G2* (BAUER et al.2001; BAUER et al. 2002).

Provavelmente, o aumento da expressão de *EIF4E* e *EIF4G* resulte na maior formação do complexo *EIF4F* (CLEMENS 2004). O aumento da tradução de RNAm que apresentam estrutura 5' muito extensa, pode requerer grande quantidade de *EIF4F*, é o caso dos genes *C-myc*, *Ciclina D1*, *VEGF* que têm papel crítico no crescimento celular (CLEMENS, 2004).

Neste estudo, pelo ensaio de *Real Time-PCR* observamos um padrão heterogêneo de expressão do gene *EIF4G2* em tumores de bexiga em relação ao tecido normal. A expressão reduzida desse gene foi encontrada em metade dos tumores analisados, a redução da expressão desse gene foi associada com

estadiamento tumoral e com o grau histológico. Esses resultados sugerem que o gene *EIF4G2* pode estar influenciando a carcinogênese de bexiga. Entretanto, novos estudos deverão ser realizados a fim de confirmar a participação de *EIF4G2* em CTT de bexiga, visto que ainda não há nenhum trabalho descrito na literatura sobre *EIF4G2* em tumores.

A análise de expressão dos genes *EIF4G2* e *CEP63* em CTT de bexiga mostrou alterações no padrão de expressão desses transcritos. Esses genes podem estar envolvidos no desenvolvimento do câncer de bexiga. Contudo, outros experimentos deverão ser realizados a fim de confirmarmos se os genes *EIF4G2* e *CEP63* possuem algum papel no processo de desenvolvimento do tumor de bexiga e se poderão ser utilizados como marcadores moleculares para os CTT de bexiga.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A técnica de *Differential Display RT-PCR* permitiu a identificação de vários transcritos diferencialmente expressos entre o tecido normal e os carcinomas de células transicionais de bexiga.
- ✓ Foram identificados transcritos diferencialmente expressos que estão localizados em regiões cromossômicas que tem sido associadas ao tumor de bexiga, como o cromossômo 1, 3, 8 e 11 sugerindo que esses transcritos possam estar envolvidos na carcinogênese de bexiga.
- ✓ A diminuição da expressão do gene *SFRP1* pode estar relacionada à carcinogênese de bexiga, e pode ser um promissor marcador molecular para carcinoma de células transicionais de bexiga.
- ✓ A metilação no promotor de *SFRP1* pode ser um dos eventos que leva a inativação do gene *SFRP1* em tumores de bexiga.
- ✓ As análises de expressão dos genes *EIF4G2* e *CEP63* mostraram alterações no padrão de expressão desses transcritos, a diminuição da expressão foi associada com o grau histológico e estadiamento clínico podendo servir como marcador para o prognóstico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson E, De Belle I, Mittal S, et al. Egr1 signaling in prostate cancer. **Cancer Biol Ther** 2003; 2:617-22.

Adshead JM, Kessler AM, Ogden CW. Genetic initiation, progression and prognostic markers in transitional cell carcinoma of the bladder: a summary of the structural and transcriptional changes, and the role of developmental genes. **Br J Urol** 1998; 82:503-12.

Amira N, Mourah S, Rozet F, et al. Non-invasive molecular detection of bladder cancer recurrence. **Int J Cancer** 2002; 101:293-7.

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. **Nature** 2003; 426:570-4.

Armes JE, Hammet F, de Silva M, Ciciulla et al. Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. **Oncogene**. 2004;23:5697-702.

Baffa R, Gomella LG, Vecchione A et al. Loss of FHIT expression in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Am J Pathol** 2000;156:419-24.

Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aaronson SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for SFRP inhibition of Wnt signaling **J Biol Chem** 1999;274:16180-7

Balmain A, Gray J, Ponder B et al. The genetics and genomics of cancer. **Nat Genet** 2003; 3:238-44.

Bandyopadhyay S, Pai SK, Gross SC et al. The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. **Cancer Res** 2003;63(8):1731-6.

Barnard GF, Mori M, Staniunas RJ et al. Ubiquitin fusion proteins are overexpressed in colon cancer but not in gastric cancer. **Biochim Biophys Acta** 1995;1272:147-53

Bauer C, Diesinger I, Brass N et al. Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma. **Cancer** 2001;92:822-9.

Bauer C, Brass N, Diesinger I et al. Overexpression of the eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G-1) in squamous cell lung carcinoma. **Int J Cancer** 2002;98:181-5.

Berkel HJ, Turbat-Herrera EA, Shi R et al. Expression of the translation initiation factor eIF4E in the polyp-cancer sequence in the colon cancer **Epidemiol Biomarkers Prev** 2001;10:663-6.

Bhanot P, Brink M, Samos CH et al. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. **Nature** 1996;382:225-30.

Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. **Science** 1991;251:1211-7.

Caldwell GM, Jones C, Gensberg K et al. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. **Cancer Res.** 2004;64:883-8.

Cavenee WK, White RL. The genetic basis of cancer. **Sci Am** 1995;272:72-9.

Celis JE, Ostergaard M, Basse B et al. Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. **Cancer Res** 1996;56:4782-90.

Chan MW, Chan LW, Tang NL et al. Frequent hypermethylation of promoter region of RASSF1A in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. **Int J Cancer** 2003;104:611-6.

Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. **Br J Cancer** 1993;68:653-61.

Chen S, Guttridge DC, You Z. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating beta-catenin/T cell factor-mediated transcription. **J Cell Biol** 2001;152:87-96.

Cho KR, Hedrick L. Genetic alterations in human tumors. **Curr Top Microbiol Immunol** 1997;221:149-76.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by cid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**. 1987;162:156-9.

Clemens MJ. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. **Oncogene** 2004;23:3180-8.

Crew JP, Fuggle S, Bicknell R, Cranston DW, de Benedetti A, Harris AL. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. **Br J Cancer** 2000;82:161-6

De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. **Oncogene** 2004;23:3189-99.

Droller MJ. Bladder cancer: state-of-the-art care. **CA Cancer J Clin** 1998;48:269-84.

Durak I, Perk H, Kavutcu M, Canbolat O, Akyol O, Beduk Y. Adenosine deaminase, 5'nucleotidase, xanthine oxidase, superoxide dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. **Free Radic Biol Med** 1994;16:825-31

Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M et al. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. **Nat Genet** 2003;33:90-6.

Finch PW, He X, Kelley MJ et al. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997;94:6770-5.

Fukuchi-Shimogori T, Ishii I, Kashiwagi K, Mashiba H, Ekimoto H, Igarashi K. Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. **Cancer Res** 1997;57:5041-4.

Fukuhara K, Kariya M, Kita M et al. Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:1729-36.

Gago-Dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. **Int J Cancer**. 2001;91:575-9.

Garcia del Muro X, Torregrosa A, Munoz J et al. Prognostic value of the expression of E-cadherin and beta-catenin in bladder cancer. **Eur J Cancer** 2000;36:357-62.

Gee JR, Montoya RG, Khaled HM, Sabichi AL, Grossman HB. Cytokeratin 20, AN43, PGDH, and COX-2 expression in transitional and squamous cell carcinoma of the bladder. **Urol Oncol** 2003;21:266-70.

Gibas Z, Gibas L. Cytogenetics of bladder cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 1997;95:108-15.

Gradi A, Imataka H, Svitkin YV et al. A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. **Mol Cell Biol** 1998;18:334-42.

Green DR. A Myc-induced apoptosis pathway surfaces. **Science** 1997;278:1246-7.

Gromova I, Gromov P, Celis JE. bc10: A novel human bladder cancer-associated protein with a conserved genomic structure downregulated in invasive cancer. **Int J Cancer** 2002;98:539-46.

Grossfeld GD, Muscheck M, Stein JP et al. Cellular proliferation and cell-cell cycle regulatory proteins as prognostic markers for transitional cell carcinoma of the bladder. **Adv Exp Med Biol** 1999;462:425-35.

Guan RJ, Ford HL, Fu Y, Li Y, Shaw LM, Pardee AB. Drg-1 as a differentiation-related, putative metastatic suppressor gene in human colon cancer. **Cancer Res** 2000;60:749-55.

Haitel A, Posch B, El-Baz M, et al. Bilharzial related organ confined muscle invasive bladder cancer: prognostic value of apoptosis markers proliferation markers p53 E-cadherin epidermal growth factor receptor and c-erbB-2. **J Urol** 2001; 165:1481-7.

Halachmi S, Linn JF, Amiel GE, Moskovitz B, Nativ O. Urine cytology tumor markers and bladder cancer. **Br J Urol** 1998; 82:647-54.

Hartmann A, Moser K, Kriegmair M, Hofstetter A, Hofstaedter F, Knuechel R. Frequent genetic alterations in simple urothelial hyperplasias of the bladder in patients with papillary urothelial carcinoma. **Am J Pathol** 1999; 154:721-7.

Hayard DG, Clarke RB, Faragher AJ, Pillai MR, Hagan IM, Fry AM. The Centrosomal Kinase Kek2 display elevated levels of protein expression in human breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:7370-6.

Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, et al Immunohistochemical p53 protein status in nonsmall cell lung cancer is a promising indicator in determining in vitro chemosensitivity to some anticancer drugs. **J Surg Oncol** 1998; 68:19-24.

Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature** 1990; 348:334-6.

Höglund M, Saal T, Heim S, Mitelman F, Mandahl N, Fadl-Elmula I. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways in transitional cell carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:8241-6.

Hornigold N, Devlin J, Davies AM, Aveuard JS, Habuchi T, Knowles MA. Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. **Oncogene** 1999; 18:2657-61.

Huang WC, Taylor S, Nguyen TB, et al. KIAA1096 a gene on chromosome 1q is amplified and overexpressed in bladder cancer DNA. **Cell Biol** 2002; 21:707-15.

Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res** 1998; 58:4023-37.

Ireland AP, Clark GWB, Demeester TR. Barrett's esophagus the significance of p53 in clinical practice. **Ann Surg** 1997; 225:17-30.

Izawa JI, Slaton JW, Kedar D, et al. Differential expression of progression related genes in the evolution of superficial to invasive transitional cell carcinoma of the bladder. **Oncol Rep** 2001; 8:9-15.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev** 2002; 3:415-27.

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

Kanayama H, Tanaka K, Aki M, et al Changes in expression of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells. **Cancer Res** 1991; 51:6677-85.

Kawakami T, Shiina H, Igawa M, et al. Inactivation of the hMSH3 mismatch repair gene in bladder cancer. **Biochem Biophys Res Comm** 2004; 325:934-42.

Keegan PE, Lunec JA, Neal DE. p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. **Br J Urol** 1998; 82:710-20.

Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. **Trends Genet** 1993; 9:317-21.

Knowles MA. What we could do now: molecular pathology of bladder cancer. **Mol Pathol** 2001; 54:215-21.

Konety BR, Nguyen TST, Dhir R, et al. Detection of bladder cancer using a novel nuclear matrix protein BLCA-4. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2618-25.

Knobloch RV, Bugert P, Jauch A, Kalble T, Kovacs G. Allelic changes at multiples regions of chromosome 5 are associated with progression of urinary bladder cancer. **J Pathol** 2000; 190:163-8.

Kontogeorgos G, Aninos D. Recent aspects in the diagnosis and prognosis of bladder cancer. **Tumori** 1998; 84:301-7.

Koo SH, Kwon KC, Ihm CH, Jeon YM, Park JW, Sul CK. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. **Cancer Genet Citogenet** 1999; 110: 87-93.

Lane DP, Crawford L. T antigen in bound to a host protein in SV40 transformed cells. **Nature** 1979; 278:261-3.

Lee AY, He B, You L, et al. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. **Oncogene** 2004; 23:6672-6.

Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M, Okada K. Reciprocal expression of bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. **Urol Res** 1998; 26:235-41.

Lianes P, Orlow I, Zhang ZF, et al. Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1325-30.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science** 1992; 257:967-71.

Liebert M, Gebharst D, Wood C, et al. Urothelial differentiation and bladder cancer In: **Advances in bladder research**. New York: Kluwer Academic; 1999.

Matsumoto H, Matsuyama H, Fukunaga K, Yoshihiro S, Wada T, Naito K. Allelic imbalance at 1p36 may predict prognosis of chemoradiation therapy for bladder preservation in patients with invasive bladder cancer. **Br J Cancer** 2004; 91:1025-31.

Meijden APM. Bladder cancer. **Br Med J** 1998; 317:1366-8.

Melkonyan H, Chang WC, Shapiro JP, et al. SARPs: A family of secreted apoptosis-related proteins. **Proc Natl AcadSci USA** 1997; 94:13636-41.

Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. **Int J Cancer** 2001; 92:370-3.

Mohrenweiser HW, Jones IM. Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: a paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation? **Mutation Res** 1998; 400:15-24.

My W, Zhuang CX, Yang HX, Liang YR. Expression of Egr-1 c-fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study. **World J Gastroenterol** 2004; 10:476-80.

Neuhaus M, Wagner URS, Schmid U, et al. Polysomies but not y chromosome losses have prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. **Hum Pathol** 1999; 30:81-6.

Orntoft T, Wolf H. Molecular alterations in bladder cancer. **Urol Res** 1998; 26:223-33.

Pan CX, Koeneman KS. A novel tumor-specific gene therapy for bladder cancer. **Med Hypotheses** 1999; 53:130-5.

Prat E, Bernues M, Caballin MR, Egozcue J, Gelabert A, Miro R. Detection of chromosomal imbalance in papillary bladder tumors by comparative genomic hybridization. **Urology** 2001; 57:986-92.

Primdahl H, Maase HVD, Christensen M, Wolf H, Orntoft T. Allelic deletions of cell growth regulators during progression of bladder cancer. **Cancer Res** 2000; 60:6623-9.

Pyronmet S, Dostie J, Sonenberg N. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. **Genes Dev** 2001; 15:2083-93.

Reiher F, Ozer O, Pins M, Jovanovic BD, Eggen S, Campell CS. p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. **J Urol** 2002; 167:1469-74.

Retz M, Lehmann J, Röder C, et al. Differential mucin *MUC7* gene expression in invasive bladder carcinoma in contrast to uniform *MUC1* and *MUC2* gene expression in both normal urothelium and bladder carcinoma. **Cancer Res** 1998; 58:5662-6.

Retz M, Lehmann J, Amann E, Wullich B, Roder C, Stockle M. Mucin 7 and cytokeratin 20 as new diagnostic urinary markers for bladder tumor. **J Urol** 2003; 169:86-9.

Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, Savas L, London IM, Pullman J. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF4E is an early event during colon carcinogenesis. **Oncogene** 1999; 18:2507-17.

Sánchez-Carbayo M. Use of high-throughput DNA Microarray to identify biomarkers for bladder cancer. **Clin Chemistry** 2003; 49:23-31.

Sardi I, Dal Canto M, Bartoletti R, Guazzelli R, Travaglini F, Montali E. Molecular genetic alterations of c-myc oncogene in superficial and locally advanced bladder cancer. **Eur Urol** 1998; 33:424-30.

Sarkis AS, Dalbagni G, Cordon-Cardo C, et al. Association of p53 nuclear overexpression and tumor progression in carcinoma in situ of the bladder. **J Urol** 1994; 152:388-92.

Saunders WS, Shuster M, Huang X, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. **PNAS** 2000; 97:303-8.

Sen S, Zhou H, Zhang RD, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:1320-9.

Sengelov L, Christensen M, von der Maase H, et al. Loss of heterozygosity at 1p 8p 10p 13q and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 123:109-13.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature** 1993; 366:704-7.

Shaw ME, Elder PA, Abbas A, Knowles MA. Partial allelotype of Schistosomiasis-associated bladder cancer. **Int JCancer** 1999; 80:656-61.

Sheweita SA, El-Maati MRA, El-Shahat FG, Bazeed MA. Changes in the expression of cytochrome P450 2E1 and the activity of carcinogen-metabolizing enzymes in *Schistosoma haematobium*-infected human bladder tissues. **Toxicology** 2001; 162:43-52.

Shozu M, Murakami K, Segawa T, Kasai T, Ishikawa H, Shinohara K, Okada M, Inoue M. Decreased expression of early growth response-1 and its role in uterine leiomyoma growth. **Cancer Res** 2004;64:4677-84.

Simon R, Eltze E, Schafer KL et al. Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. **Cancer Res** 2001;61:355-62.

Sorrells DL, Black DR, Meschonat C et al. Detection of eIF4E gene amplification in breast cancer by competitive PCR. **Ann Surg Oncol** 1998;5:232-7.

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA et al. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. **J Urol** 1998;160:645-59.

Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H et al. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. **Lab Invest** 2004 ;84:465-78.

Strachan T And Read. A Somatic mutations and cancer **Human Molecular Genetics** Bios Scientific publishers 1996.

Sugimura T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat Res** 1998;402:7-14.

Suzuki H, Gabrielson E, Chen W et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. **Nat Genet.** 2002;31:141-9.

Suzuki H, Watkins DN, Jair KW et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. **Nat Genet.** 2004;36:417-22.

Sweeney CJ, Marshall MS, Barnard DS et al. Cyclo-oxygenase-2 expression in primary cancers of the lung and bladder compared to normal adjacent tissue. **Cancer Detect Prev** 2002;26:238-44.

Takada T, Yagi Y, Maekita T et al. Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers. **Cancer Sci** 2004;95:741-4.

Takahashi T, Futamura M, Yoshimi N et al. Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. **Jpn J Cancer Res** 2000;91:1007-14.

Tiguert R, Lessard A, So A, Fradet Y. Prognostic markers in muscle invasive bladder cancer. **World J Urol** 2002;20:190-5.

Thykjaer T, Workman C, Kruhoffer M et al. Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. **Cancer Res.** 2001;61:2492-9.

ThykJaer T, Christensen M, Clark AB, Hansen LR, Kunkel TA, Orntoft TF. Functional analysis of the mismatch repair system in bladder cancer. **Br J Cancer** 2001;85:568-75.

Ugolini F, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ et al. WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. **Oncogene** 2001;20:5810-7.

Uren A, Reichsman F, Anest V et al. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. **J Biol Chem** 2000;275:4374-82.

Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. **Am J Pathol** 2002;161:1199-206.

Vaish M, Mishra SK, Mandhani A, Mittal RD, Mittal B. Assessment of microsatellite instability in bladder and thyroid malignancies. **Teratog Carcinog Mutagen** 2003;1:255-65.

Vecchione A, Ishii H, Baldassarre G et al. FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. **Am J Pathol** 2002;160:1345-52.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. **Science** 1995;270:484-7.

Veltman JA, Fridlyand J, Pejavar S et al. Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. **Cancer Res** 2003;63:2872-80.

Venitt S. Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer. **Clin Chem** 1994;40:1421-5.

Vriesema JL, Aben KK, Witjes JA, Kiemeny LA, Schalken JA. Superficial and metachronous invasive bladder carcinomas are clonally related. **Int J Cancer** 2001;93:699-702.

Xu K, Hou S, Du Z. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in bladder carcinoma. **Chin Med J (Engl)** 2002;115:743-5.

Wang FL, Wang Y, Wong WK et al. Two differentially expressed genes in normal human prostate tissue and in carcinoma. **Cancer Res** 1996;56:3634-7.

Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, Rosenwald IB, Safran MS, Patwardhan NA, Khan A. Expression of eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha correlates with the progression of thyroid carcinoma. **Thyroid** 2001;11:1101-7.

Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, Wang GY. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. **World J Gastroenterol** 2004;10:550-4.

Wai CY, Miller DS. Urinary bladder cancer. **Clin Obstet Gynecol** 2002 ;45:844-54.

Weber BL. Cancer genomics. **Cancer Cell** 2002;1:37-47.

Weinberg RA. How cancer arises. **Scientific American** 1996;273:32-136.

Whartenby KA, Abboud CN, Marrogi AJ, Ramesh R, Freeman SM. The biology of cancer gene therapy. **Lab Invest** 1995;72:131-45.

Wheeler MA, Hausladen DA, Yoon JH, Weiss RM. Prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 induction in human urinary tract infections and bladder cancer. **J Urol** 2002;168:1568-73.

Williams ED. Mechanisms and pathogenesis of thyroid cancer in animals and man. **Mutat Res** 1995;333:123-9.

Williams SG, Buscarini M, Stein JP. Molecular markers for diagnosis, staging, and prognosis of bladder cancer. **Oncology** 2001;15:1461-70.

Wong SC, Lo SF, Lee KC, Yam JW, Chan JK, Wendy Hsiao WL. Expression of frizzled-related protein and Wnt-signalling molecules in invasive human breast tumours. **J Pathol** 2002;196:145-53.

Yano A, Nakamoto T, Hashimoto K, Usui T. Localization and expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human urothelial cancer. **J Urol** 2002;167:729-34.

Zhao J, Richter J, Wagner U et al. Chromosomal imbalances in noninvasive papillary bladder neoplasms (pTa). **Cancer Res** 1999;59:4658-61.

Zhou Z, Wang J, Han X, Zhou J, Linder S. Up-regulation of human secreted frizzled homolog in apoptosis and its down-regulation in breast tumors. **Int J Cancer** 1998;78:95-9.