

**DETECÇÃO DA HIPERMETILAÇÃO EM
PROMOTORES DOS GENES *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* E *E-
CAD* COMO MARCADOR MOLECULAR PARA O
CÂNCER DE BEXIGA**

MARIANA BRAIT RODRIGUES DE OLIVEIRA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Otávia Luisa Silva Damas de
Caballero**

Co-Orientador: Dr. André Luiz Vettore de Oliveira

Supervisor Estrangeiro: Dr. David Sidransky

São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Brait, Mariana

**Detecção da hipermetilação em promotores dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* ,
APC e *E-CAD* como marcador molecular para o câncer de bexiga / Mariana
Brait Rodrigues de Oliveira -- São Paulo, 2006.**

93p.

Tese (Doutorado)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Otávia Luisa Silva Damas de Caballero.

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

“Para chegar à realidade, uma idéia começa por se apoderar de espíritos fervorosos e escraviza-os; a partir desse momento, eles lhe pertencem e não vêem diante de si se não o objetivo a atingir.

Por vezes, esse objetivo parece intangível: quanto mais nos adiantamos, mais ele nos parece distante.

Mas que importa?

Os escravos de uma idéia são incapazes de desanimar.”

(Marie Curie)

DEDICATÓRIA

Dedico a minha tese inteiramente para os meus pais. Para a minha maravilhosa mãe Beth Brait por toda a paciência e experiência em pesquisa. Para o meu papai "sabe-tudo" Moracy Rodrigues de Oliveira por todos os conselhos e colos. Para a minha madrasta "boastra" Rosemary Vernice da Silva pelas conversas e intuições. Agradeço aos três pelo amor incondicional, por acreditarem nos meus sonhos, dando suportes financeiro, emocional e profissional e por sempre torcerem e fazerem o que está em seus alcances para que meus objetivos sejam alcançados. Pela herança genética e de convivência e aprendizado (ambiental).

Dedico também à minha tia Terezinha Rodrigues de Oliveira, à sua memória, por todo apoio que sempre me deu, pelo exemplo de luta e resistência, por todo o amor, dedicação e por mostrar que sempre podemos ajudar outras pessoas, independentemente das nossas próprias condições.

Dedico em especial aos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer à minha querida orientadora **Dra. Otávia Caballero** por todo o caminho que percorremos juntas nesses quase seis anos (mestrado + doutorado). Por toda a sua paciência e atenção comigo, pelo apoio, torcida e pela confiança depositada no meu trabalho. Jamais poderei agradecer o suficiente por ela ter me aberto as portas do laboratório do Dr. Sidransky (e também por me hospedar com vista para o “Empire State Building”). Tive muita sorte em ter como orientadora uma pessoa que é um exemplo de lealdade, ética, competência e capacidade de trabalho. Muito obrigada para essa pesquisadora e amiga que vai ser sempre a minha “Mãe da Ciência”.

Agradeço ao meu querido co-orientador **Dr. André Vettore** pela importante contribuição ao meu aprendizado, pela disponibilidade em me ajudar, por compartilhar a torcida pelo Timão e por ter me recebido na minha volta ao Brasil.

Agradeço ao **Dr. David Sidransky** por ter me recebido no seu laboratório na Johns Hopkins Medical Institutions em Baltimore (Estados Unidos), onde passei a melhor e mais empolgante fase profissional da minha vida. Pelas oportunidades de participar de vários projetos, além do inicialmente proposto e pelas discussões dos resultados obtidos. Pelos “lab meetings”, nos quais eu pude admirar a facilidade e domínio com que ele expõe seu conhecimento extremamente amplo, momentos em que aprendi muita ciência e principalmente a ser mais crítica.

Agradeço ao **Dr. Mohammad O. Hoque** por ter sido um ótimo amigo e parceiro de trabalho, por tudo o que ele me ensinou, pela paciência, pela sua enorme generosidade e por me dar oportunidades de trabalhar com ele em muitos projetos, sempre confiando na minha capacidade e me estimulando a aprender mais.

Agradeço ao **Dr. André Carvalho** pela análise estatística da primeira fase do trabalho, pela parceria no laboratório em Baltimore e por tudo o que me ensinou.

Agradeço especialmente a ele e à sua esposa **Cynthia** por terem tornado a minha estadia em Baltimore fácil desde o princípio, por todos os jantares, filmes, supermercados, longas conversas e caminhadas com a Mel.

Um obrigada muito especial para a minha amiga e eterna companheira de laboratório **Marcia Dellamano**, por todo o aprendizado em conjunto, por sempre confiarmos uma na outra para lermos os respectivos trabalhos, pelas críticas científicas e por compartilharmos a opinião nada parcial de que os defeitos e erros sempre são dos outros e nunca nossos. Também pela paciência nos meus momentos difíceis e pelo seu entusiasmo verdadeiro com as minhas conquistas. E, é claro, pelos inúmeros planos, baladas e aventuras.

Agradeço à minha amiga Lu Japinha (**Luciane Kagohara**) por todas as conversas compridas sobre mil assuntos, pelas opiniões trocadas, pela amizade sincera que cresceu muito desde a relação “bixete-veterana” de Botucatu e também por tantas diversões juntas.

Agradeço a **Andréa Seixas** pela ajuda neste trabalho desde o começo quando me ensinou as coisas básicas do laboratório e pelo carinho.

Agradeço a todo o pessoal do **Laboratório de Genética do Câncer**, nas suas diferentes formações. À equipe mais antiga com quem tive mais contato, pela ótima convivência e pelo carinho: ao meu grande amigo Fabio Piccoli pelas variadas conversas, por dar crédito às minhas opiniões e pelo jeito T.O.C., compartilhado com a Andréa; Danielle Renzoni pela sinceridade e amizade; Daniel Vidal (o Pig dos nossos “Três Porquinhos”) pelo divertido convívio desde os tempos de Botucatu, assim como Adriana Bulgarelli e Mariana Maschietto; Fabrício Carvalho pela ajuda; Roberta Felix pelas risadas; Fernanda Goes por sempre estar disposta a falar; Simone Srendi e Maria Isabel Achatz por serem exemplos de mães cientistas. À mais recente formação que me recebeu muito bem: Cláudia Pereira, Roberta Lessa, Viviane Sonaglio, Luís Sakamoto, Ana Carolina Carvalho, Benjamin Heck, Alex Yuri, Emerson Santos e Valéria Andrade.

Agradeço ao **Dr. Andrew Simpson** pela confiança no meu trabalho, por todas as oportunidades, começando pelo ingresso no Laboratório de Genética do Câncer e também pela atenção e gentileza comigo em todos os momentos.

Agradeço ao **Prof. Dr. Fernando Soares** do Departamento de Anatomia Patológica pela importante colaboração nesse trabalho e por acompanhar meu projeto através da banca de qualificação.

Agradeço ao **Dr. Hugo Campos** do Departamento de Anatomia Patológica, pela seleção e microdissecção das amostras e por sempre ser agradável e divertido.

Agradeço ao **Prof. Dr. Álvaro Sarkis** por tudo o que me ensinou sobre clínica, graças a ele eu sou capaz de desenhar uma bexiga (bem esquemática) com os tumores em diferentes estadios. E também pelas oportunidades oferecidas e confiança no meu trabalho e capacidade.

Agradeço ao **Dr. Marcos Leal** pela ajuda na coleta dos dados clínicos adicionais na primeira fase do trabalho e esclarecimento sobre os mesmos.

Agradeço ao **Dr. Benedito Rossi** por ter se disposto a me ajudar e por ter causado a mudança da minha visão do mundo da cirurgia e da clínica. Por tudo o que me ensinou no centro cirúrgico e principalmente por ter me dado uma oportunidade que me permitiu olhar a ciência com novos olhos, entender melhor a necessidade de trabalhar com pessoas de formações diversas para desvendar as questões de maneira mais ampla e me ensinado que sempre antes da minha amostra de DNA tem um paciente que teve medo e que tem uma história. Agradeço também a todos que me ajudaram no centro cirúrgico, em especial à equipe da Pélvis.

Agradeço ao **Prof. Dr. Kowalski** pela disposição em me ajudar e à **Enfermeira Julia** do Departamento de Cabeça e Pescoço pela organização e coleta de amostras.

Agradeço a todas as pessoas do “**Head and Neck Cancer Research Lab**” na “Johns Hopkins Medical Institutions” com sua estrutura e condições de trabalho maravilhosas: Dr. David Sidransky, Dr. Mohammad Hoque, Dr. Joe Califano, Dr. Barry Trink, Dr. Edward Ratovitski, Luana Poeta, Wei-Wen, Juna Lee, Hannah Park, Sunil Upadhyay, Tony e Alice Chuang, Maryana Ellis, Zhongmin Guo, Jongchul Park, Shaoyu Zhou, Chunyan Liu, Mousiumi Dhara, Ming Zhao, Min Joo Park, Woo, Chetan Nayak, Junwei Liu, Elisabeth Mambo Aditi Chatterjee, Guojun Wu, Motonobu Osada, Jamie Hu, Soo Kim, Mingzhao Xing, Quia Claybourne, Jamie, Simy Buckwold, Chad Glazer Constance Monitto e muito mais pessoas, por tudo que me ensinaram, por sempre me tratarem bem, pela amizade, pelas colaborações e por terem feito parte deste ano maravilhoso que passei em Baltimore. Um agradecimento especial à minha amiga italiana Luana pelas risadas, a Wei-Wen pelos jantares, a Juna e Hannah pelas conversas e a cada uma das pessoas do laboratório que foram tão importantes para mim.

Agradeço à **Dra. Shahnaz Begum** e **Dr. William Westra** do Departamento de Patologia da Johns Hopkins Medical Institutions pelas revisões das lâminas e ainda à Dra. Shahnaz pela amizade.

Agradeço à **Dra. Marianna Zahurak** pela análise estatística da parte do projeto realizada na Johns Hopkins, Baltimore, MD, Estados Unidos.

Agradeço ao **Dr. Bogdan A. Czerniak** do M.D. Anderson Cancer Center pelas amostras de tumores de bexiga gentilmente cedidas.

Agradeço ao **Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer**, ao **Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo** e à **Fundação Antônio Prudente**, nas pessoas de seus diretores e corpo administrativo, pelas excelentes condições de trabalho e ótimos anos de aprendizado que passei aqui.

Agradeço à **Dra. Vilma Martins**, ao **Dr. Francisco Nóbrega** e à **Dra. Eloiza Tajara** pela atenção e competência ao lerem os meus relatórios de qualificação.

Agradeço a **Carlos Nascimento, Miyuki Silva e Severino Silva** pela organização e competência na manipulação das amostras. Também agradeço muito a **Bel** e a **Lea** pelo trabalho competente e por animarem o dia-a-dia.

Agradeço a todos os colegas do Instituto Ludwig pelas grandes e pequenas ajudas no dia-a-dia, pelas conversas de corredor, pelas reuniões e pela amizade.

Agradeço às secretárias da Pós-Graduação: **Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeira e Márcia Hiratani** por fazerem de tudo pelos alunos, por agüentarem o humor duvidoso de todos às quartas-feiras às 7h da manhã e principalmente pelo carinho e amizade. Em especial, um agradecimento para as meninas Ana e Luciana, pelo quanto me ajudaram na fase final.

Agradeço à toda a **equipe da Biblioteca do Hospital do Câncer** (Suely Francisco, Rosinéia Aguiar Carneiro, Francyne Pólen Gomes de Lima, Janaína Beltrame dos Santos) por sempre estarem dispostas a ajudar, pela competência e pelas correções feitas na bibliografia.

Agradeço mais um vez (e sempre) **ao Dr. Emmanuel Dias Neto** por ter me apresentado para a Dra. Otávia.

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

Agradeço a **CAPES** pela bolsa PDEE de doutorado “sanduíche” concedida para a minha estadia na Johns Hopkins, a **FAPESP** pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado do Brasil e do CEPID e ao **Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer** pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver o nosso projeto.

Agradeço à Banca Julgadora da Tese pelo tempo atribuído à leitura desta tese.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à minha mãe Beth Brait pela relação única de amor e amizade que temos, pelas mil ajudas sempre, pelas risadas e pelas nossas aventuras viajando pelo mundo.

Agradeço ao meu pai Moracy Rodrigues de Oliveira pela dedicação, por tudo o que me ensina, pelas viagens sempre boas e pelo grande amor.

Agradeço à minha madrastra Rosemary Vernice da Silva por sempre estar ao meu lado, por me mostrar o quanto sou parecida com meu pai, pela diversão durante as nossas viagens e pelo amor especial.

Agradeço à minha tia Regina Rodrigues de Oliveira, a tia lindinha Rê, por todas as conversas, as dicas de relaxamento, a torcida, o interesse pelo meu trabalho, as ajudas em qualquer assunto, por sempre me mimar, deixando o meu mundo mais lindo e lilás.

Agradeço de maneira muito especial a minha avó Lyly (Lydia Vernice da Silva) por ser uma avó fantástica, cheia de carinho, por sempre rezar por mim e por entender quando eu não tenho tempo de ir visitá-la sem ficar muito brava.

Agradeço à minha tia Zina, tio Duda, Beto, Kátia e Love (Fernando) pelo interesse pelo meu trabalho e pelo carinho da família. Agradeço Luizinho, Nilza, Laura e Júlia pela amizade e torcida pelo meu sucesso. Agradeço também aos meus avós.

Um agradecimento especial a três grandes amigos, companheiros de UNESP e de Ludwig: Fabiana Bettoni (Bu), Raphael Bessa (Jaó) e Lilian Campos Pires (Paia). A Bu pela amizade mais do que especial, pelas nossas conversas intermináveis, pelo apoio, por sempre estar do meu lado, pelas muitas baladas e pela

sinceridade. A Paia pelo sobrinho mais lindo que eu tenho, pela grande amizade, pelas teorias compartilhadas sobre marcianos e pelas bagunças. Ao meu sempre irmão Jaó, por ter cuidado bem na minha casinha durante o sanduíche e pela amizade divertida.

Agradeço às minhas amigas básicas e irmãs Laís Miller, Ana Luisa Ornellas e Carol Rossi pela amizade antiga, sincera e grudada, por acharem que eu sou capaz de realizar qualquer atividade profissional e por deixarem a minha vida cheia de conversas e alegria. Um super obrigado aos meus queridos amigos que estão sempre na torcida e companheiros de bagunças: Tra (Maísa), Sali (Ana Helena), Bibi (Bia Lucchesi), Vi (Michelli), Bruno, Bijou (Zé), Broto (Gonzalo), Zé Mauro, Baks (Joana), Glote (Ana Paula), Fernanda, João Paulo, Ké (Cleverson), Bozó (Alisson), João Gabriel e tantos outros que sempre estão me apoiando e me animando. Aos amigos feitos no “Aky Madrid” pela diversão garantida, em especial aos que trouxeram novas trilhas sonoras.

Aos amigos de Botucatu, que próximos ou distantes, deixam a vida mais gostosa, relembando os bons tempos ou criando novos momentos. Aos amigos do São Luís e da Pacaembu, amizades que permitem que a gente continue um pouco criança-adolescente, em especial a todos da “Humanas Nerds”.

Agradeço aos meus padrinhos Cecília Leonel e Antonio Dimas pelo carinho e pelo apoio. Também a Glorinha, Fiorin, Maria Adélia, Marisa, Franco, Maria Inês, Veronique (principalmente por compartilhar sua gatinha Zazie) e tia Lucinha pela amizade e pelo entusiasmo com a minha carreira em uma área diferente da deles.

Agradeço ao Dago (Dagoberto Guimarães Neto) pela preocupação com meu trabalho, pelas comemorações e pelo carinho com a minha Mãe e comigo.

Agradeço aos amigos de Baltimore: principalmente ao Mauro Marelli e às meninas do treino de vôlei, em especial a Monica McDonough.

Agradeço ao Dinguinha por sentar no computador na hora em que ele achava que eu deveria dar uma pausa, por deitar nos “papers” me fazendo dar risadas, por tornar a vida mais engraçada com suas atitudes inesperadas e por ser o gatinho bravo mais amoroso que alguém pode ter.

E a todos que deram a sua contribuição pequena ou grande para que eu chegasse até aqui e que me perdoarão caso eu tenha esquecido de mencioná-los.

RESUMO

Brait M. **Detecção da hipermetilação em promotores dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* como marcador molecular para o câncer de bexiga.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

O câncer de bexiga está entre os dez tipos de câncer mais freqüentes em todo o mundo. Os mecanismos de carcinogênese e o aparecimento de recorrências no câncer de bexiga não estão esclarecidos, portanto o desenvolvimento de marcadores moleculares para melhorar o diagnóstico ou prever a ocorrência de recidivas levaria a um controle mais efetivo deste tipo tumoral. Marcadores de tumores baseados na detecção de metilação aberrante em promotores de genes classificados como supressores de tumor (e candidatos) têm se mostrado como abordagens eficazes em potencial para o diagnóstico de tumores. Nós selecionamos quatro genes (*E-CAD*, *RAR β* , *14-3-3 σ* e *APC*) que já foram demonstrados hipermetilados em diversos tipos tumorais e investigamos seu status de metilação em 73 tumores de bexiga. O DNA foi extraído de tumores emblocados em parafina e submetidos a MSP. As freqüências de metilação observadas foram 71,2% para *14-3-3 σ* , 58,9% para *APC*, 49,3% para *RAR β* e 28,8% para *E-CAD*. Quase 91% das amostras apresentaram um ou mais genes metilados. Como a metilação de *14-3-3 σ* ainda não havia sido demonstrada em tumores de bexiga, linhagens celulares derivadas deste tipo tumoral que tinham seu padrão de metilação conhecido para este gene foram submetidas ao tratamento com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina e após este tratamento, a expressão deste gene foi restabelecida. Em seguida, nós selecionamos 21 genes (*CTNNB1*, *CALCA*, *hMLH1*, *PGP9.5*, *DAPK*, *CCND2*, *HIC1*, *AIM1*, *DCC*, *MINT1*, *MINT31*, *FANC-F*, *TGF- β* , *ATM*, *CRBP*, *THBS1*, *14-3-3 σ* , *CCNA1*, *ESR*, *FHIT* e *MTIG*) para terem seu padrão de metilação estudados através da técnica de QMSP: MSP fluorigênica quantitativa em tempo real. Estes genes foram analisados em um conjunto de avaliação composto de 25 tumores de bexiga e 5 normais. Foram selecionados sete genes baseados nas suas freqüências no conjunto de avaliação. Os sete genes (*CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1*) foram então testados

em um conjunto de validação composto de 93 amostras tumorais e 26 normais. Nenhuma metilação foi observada em amostras normais para os genes *MINT1* e *CCNA1*. Em amostras de câncer de bexiga, encontramos 57% de metilação em *CCNA1* e 31,2% em *MINT1*. Em tumores, a frequência de hipermetilação de *CRBP* foi de 38,7% e em normais de 3,9%. O gene *CALCA* apresentou-se metilado em 64,5 dos tumores e 15,4% dos normais. Em 19,2% dos normais foi observada hipermetilação em *PGP9.5* e *CCND2* e nos tumores 71% e 57%, respectivamente. Metilação em *AIM1* estava presente em 83,9% dos tumores e em 27% das amostras normais. Geralmente os níveis de metilação foram maiores amostras de câncer do que em normais. Quase 95% das amostras tumorais mostraram pelo menos um dos sete genes metilados. As altas frequências de metilação encontradas tanto por MSP quanto por QMSP para os genes estudados em amostras tumorais e as baixas frequências em amostras normais (considerando os 7 estudados em amostras normais) sugerem que estas alterações epigenéticas são importantes para o desenvolvimento do câncer de bexiga. Nossos resultados também demonstram que QMSP utilizando os genes aqui selecionados podem apresentar especificidades e sensibilidades adequadas para o uso clínico destes testes na rotina. Estudos mais amplos com maior número de amostras e seguimento longitudinal e o teste destes marcadores em DNA extraído de urina vão ajudar a definir a sua utilidade para a detecção precoce de câncer de bexiga e o acompanhamento desta doença.

SUMMARY

Brait M. **Detection of promoter hypermethylation of *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC*, and *E-CAD* as a molecular marker for bladder cancer.** São Paulo; 2006. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Bladder cancer is among the ten most frequent cancer types worldwide. Mechanisms of bladder carcinogenesis and the development of recurrent bladder cancer remain unclear; therefore, the development of molecular markers to improve diagnosis or tumor recurrence prediction would facilitate more effective management of this cancer type. Tumor markers based on the detection of aberrant promoter methylation of several known or putative tumor suppressor genes offer a potentially powerful approach for cancer detection. We selected four genes (*E-CAD*, *RAR β* , *14-3-3 σ* , and *APC*), frequently silenced by aberrant methylation in different tumor types, and investigated their aberrant methylation profile in 73 bladder tumors. DNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded sections and the DNA was subjected to MSP. Methylation frequencies of the tested genes were 71.2% for *14-3-3 σ* , 58.9% for *APC*, 49.3% for *RAR β* , and 28.8% for *E-CAD*. Almost 91% of the samples studied showed one or more of these genes methylated. Because *14-3-3 σ* hypermethylation was not described in bladder cancer, cell lines known to be methylated and unmethylated for this gene were submitted to the treatment with the demethylating agent 5'-aza-2'-deoxycytidine and the expression of this gene was restored. We then selected additional 21 genes to study their methylation status (*CTNNB1*, *CALCA*, *hMLH1*, *PGP9.5*, *DAPK*, *CCND2*, *HIC1*, *AIM1*, *DCC*, *MINT1*, *MINT31*, *FANC-F*, *TGF- β* , *ATM*, *CRBP*, *THBS1*, *14-3-3 σ* , *CCNA1*, *ESR*, *FHIT*, and *MTIG*) by quantitative fluorogenic real-time methylation specific PCR (QMSP) in an evaluation set consisting of 25 bladder tumor samples and 5 bladder normal samples. Based on the frequency of methylation observed for these genes in the evaluation set, we selected 7 candidate genes (*CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP*, and *CCNA1*) for further analysis in a set of 93 tumor samples and 26 normal controls. We found no methylation in normal samples for *MINT1* and

CCNAI. In primary bladder tumors, we found *CCNAI* hypermethylation in 57% and *MINT1* hypermethylation in 31,2%. *CRBP* hypermethylation was observed in 38.7% of the tumors samples and 3.9% of the normal samples. *CALCA* hypermethylation was observed in 64,5% of the tumors and 15,4% of the normal samples. 19,2% of normal samples showed methylation for *PGP9.5* and *CCND2*, and 71% and 57% of the tumors, respectively. *AIM1* hypermethylation was present in 83.9% of tumor samples and 27% of the normal ones. In general, methylation levels were higher in tumors compared with normal samples. Almost 95% of the tumor samples showed one or more of these genes methylated. The high frequencies of hypermethylation found both by MSP and QMSP assay for the genes selected in tumor samples and the very low frequency observed in normal tissues (considering the seven genes studied in normal samples) suggest that these epigenetic alterations are important in bladder cancer development. Our results also demonstrate that the QMSP using the genes selected in this study may have the desired specificity and sensitivity for routine clinical use. Further studies using large cohorts with longitudinal follow up and testing these markers in urine DNA will help defining their utility for early bladder cancer detection and disease monitoring.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Perfil de metilação da região promotora dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* em de linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga. 43
- Figura 2** Resultados representativos de reações de MSP para os genes *14-3-3 σ* , *APC*, *E-CAD* e *RAR β* . 45
- Figura 3** A expressão de *14-3-3 σ* em nível de mRNA aumenta quando a linhagem celular J82 é tratada com 5-Aza-dCR. 48
- Figura 4** Gráfico demonstrativo de dispersão em escala logarítmica que expõe as razões obtidas para o gene *PGP9.5* (normalizado com *β -actina*) para as amostras normais e de tumores de bexiga do conjunto de validação. 54
- Figura 5** Gráfico de dispersão em escala logarítmica demonstrativo que expõe as razões obtidas para o gene *CRBP* (normalizado com *β -actina*) para as amostras normais e de tumores de bexiga do conjunto de validação. 55
- Figura 6** Curva ROC de dois passos utilizando num passo os genes com 100% de especificidade (*CCNA1* e *MINT1*) seguida de análise de regressão logística para os outros cinco genes estudados (*CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1* e *CRBP*). 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros clínico-patológicos das amostras tumorais do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo	41
Tabela 2	Frequência de metilação dos genes <i>14-3-3σ</i> , <i>RARβ</i> , <i>APC</i> e <i>E-CAD</i> nas amostras de pacientes portadores de câncer de bexiga atendidos no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo	44
Tabela 3	Frequência de metilação dos 21 genes nas amostras de tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras normais de bexiga, utilizados na segunda parte (atendidos no hospital Johns Hopkins)	51
Tabela 4	Frequência de metilação dos genes <i>CALCA</i> , <i>PGP9.5</i> , <i>CCND2</i> , <i>AIM1</i> , <i>MINT1</i> , <i>CRBP</i> e <i>CCNA1</i> nas amostras de tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras normais de bexiga (de pacientes atendidos no hospital Johns Hopkins ou no MD Anderson) do grupo de validação	52
Tabela 5	Parâmetros clínico-patológicos das amostras tumorais do conjunto de validação (pacientes atendidos no Hospital Johns Hopkins ou MD Anderson).	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Seqüência dos “primers” utilizados na MSP	30
Quadro 2	Condições padronizadas durante o mestrado para a MSP	42
Quadro 3	Seqüência dos “primers” e sondas utilizados na QMSP	50
Quadro 4	Valores dos coeficientes de correlação de Pearson dos genes <i>CALCA</i> , <i>PGP9.5</i> , <i>CCND2</i> , <i>AIM1</i> , <i>MINT1</i> , <i>CRBP</i> e <i>CCNA1</i> , analisando as amostras do grupo de validação.	59
Quadro 5	Valores de especificidade e sensibilidade dos genes <i>CALCA</i> , <i>PGP9.5</i> , <i>CCND2</i> , <i>AIM1</i> , <i>MINT1</i> , <i>CRBP</i> e <i>CCNA1</i> , analisando as amostras do grupo de validação	60

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Bexiga	1
1.2	Marcadores Moleculares e Metilação	9
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	MATERIAS E MÉTODOS	24
3.1	Amostras de Tumores e Linhagens Celulares	24
3.2	Extração de DNA	25
3.3	Tratamento com Bissulfito de Sódio	26
3.4	Reação de PCR - MSP	30
3.5	Tratamento de Linhagens Celulares com 5-Aza Cdr (Extração de DNA e RNA)	31
3.6	RT-PCR qualitativa de <i>14-3-3σ</i>	33
3.7	RT-PCR de <i>14-3-3σ</i> em Tempo Real	34
3.8	Reação de MSP Quantitativa em Tempo Real (QMSP)	35
3.9	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Amostras de Tumores de Bexiga de Pacientes atendidos no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo	39
4.2	Perfil de Metilação dos Genes <i>14-3-3σ</i> , <i>RARβ</i> , <i>APC</i> e <i>E-CAD</i> dos Tumores Estudados	42
4.3	Correlação entre a Metilação dos Genes <i>14-3-3σ</i> , <i>RARβ</i> , <i>APC</i> e <i>E-CAD</i> e os Parâmetros Clínico-Patológicos das Amostras	46
4.4	Efeito da Metilação sobre a Expressão de <i>14-3-3σ</i>	46

4.5	Genes Selecionados para a Análise com a Técnica de MSP Quantitativa (QMSP)	49
4.6	Características dos Pacientes Incluídos no Grupo de Validação	55
4.7	Correlação entre a Metilação dos Genes <i>CALCA</i> , <i>PGP9.5</i> , <i>CCND2</i> , <i>AIM1</i> , <i>MINT1</i> , <i>CRBP</i> e <i>CCNA1</i> e os Parâmetros Clínico-Patológicos das Amostras	58
5	DISCUSSÃO	64
6	CONCLUSÕES	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE BEXIGA

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo e é considerado um dos principais problemas de saúde pública, especialmente em países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, uma em cada quatro mortes é decorrente de câncer e esta malignidade é a segunda causa de morte, perdendo apenas para doenças cardíacas (JEMAL et al. 2006). No Brasil, atualmente, o câncer é a segunda causa mais freqüente de morte por doenças. Analisando as diferentes regiões do Brasil, o câncer é encontrado entre as primeiras causas de morte, ao lado das doenças do aparelho circulatório, doenças do aparelho respiratório, afecções do período perinatal e doenças infecciosas e parasitárias (Ministério da Saúde 2005).

O câncer de bexiga se encontra entre os dez mais freqüentes em todo o mundo, considerando homens e mulheres. É o quinto tipo de câncer mais incidente no mundo ocidental (MARUYAMA et al. 2001; DOMINGUEZ et al. 2002). A incidência do câncer de bexiga nos Estados Unidos tem se mostrado estável, mas com um pequeno crescimento. Podemos observar essa tendência, comparando o número de casos novos diagnosticados no ano de 2000: cinquenta e três mil novos casos de câncer de bexiga (MARUYAMA et al. 2001), cinquenta e seis mil novos casos de câncer de bexiga foram diagnosticados no ano de 2002 nos Estados Unidos (BORDEN et al. 2003) e a previsão para 2006 calcula a ocorrência de sessenta e um mil, quatrocentos e vinte novos casos (JEMAL et al. 2006).

No Brasil, segundo os índices do Ministério da Saúde fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de bexiga se encontra entre os dez de maior incidência no país, no entanto as estatísticas mais recentes para este tipo tumoral datam de 1999. Foi estimado o aparecimento de sete mil quinhentos e cinquenta casos novos de câncer de bexiga no Brasil para o ano de 1999, segundo dados do INCA (Ministério da Saúde 2005). No município de São Paulo no ano de 1998, houve setecentos e setenta e oito casos reportados em homens e duzentos e setenta em mulheres (MIRRA et al. 2001).

No que diz respeito à sua incidência, é maior em homens que em mulheres, com uma proporção aproximada de 3:1. Para o ano de 2006, nos Estados Unidos, foram previstos 44.690 casos novos de câncer de bexiga em homens (sendo o quarto tipo mais incidente e representando 3% das neoplasias do sexo masculino) e 16.730 em mulheres (sendo o nono tipo mais freqüente e representando 2% das neoplasias do sexo feminino), o que significa uma proporção de 2,7 (JEMAL et al. 2006).

A incidência do câncer de bexiga é maior em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento; maior em áreas urbanas do que em áreas rurais. Acrescenta-se a isso o fato de que 80% dos pacientes têm acima de 59 anos de idade.

Fatores ambientais parecem ter um papel significativo na carcinogênese do câncer de bexiga (JUNG e MESSING 2000). O fator de risco mais importante é o tabaco, 50% das neoplasias de bexiga podem ser atribuídas ao uso de cigarro (DINNEY et al. 2004; BORDEN et al. 2005). O segundo maior fator de risco inclui exposição petroquímica e outras exposições industriais (DINNEY et al. 2004), como a exposição industrial às arilaminas, substâncias encontradas em fábricas de borracha e de tingimento de tecido (nestes casos o aparecimento do câncer ocorre no prazo de

quinze a vinte anos após a primeira exposição). Outros fatores importantes são: infestações por *Schistosoma Haematobium*, que depositam seus ovos na parede vesical e a irritação mecânica crônica provocada pela presença destes ovos calcificados no epitélio desencadeia uma resposta inflamatória crônica exuberante que induz metaplasia e displasia escamosa progressivas da mucosa e, em alguns casos, neoplasias. A infecção por *S. Haematobium* é especialmente problemática no Egito, onde o câncer de bexiga representa um terço de todos os tipos de câncer e com um pico de incidência mais precoce comparado ao resto do mundo (50 anos em homens) (GUTIERREZ et al. 2004). Outros fatores de risco incluem a cistite crônica (a irritação crônica pode resultar em metaplasia e displasia e finalmente em neoplasia); exposição maciça à ciclofosfamida (imunossupressor que pode aumentar em até dez vezes o risco de câncer vesical em doze anos de exposição) e radioterapia na região pélvica, por exemplo, contra carcinomas de ovário e próstata. O aparecimento do câncer ocorre no prazo de cinco a dez anos após a exposição à radiação e dependendo da dose administrada, há um risco aumentado de uma a quatro vezes do aparecimento de recidiva.

A susceptibilidade ao câncer de bexiga parece estar relacionada a fatores genéticos que afetam individualmente o metabolismo dos carcinógenos, o que ajudaria a explicar porque pessoas com o mesmo tipo de exposição aos mesmos compostos carcinogênicos têm chances diferentes de desenvolvimento desse tipo tumoral (BORDEN et al. 2005). Não há relações bem estabelecidas para fatores hereditários nesse tipo de câncer.

Muitos estudos têm procurado determinar características moleculares do câncer de bexiga. Elas compreendem deleções no cromossomo 9, que podem ocorrer

em mais de 60% das neoplasias de bexiga e parecem ser eventos precoces, deleções nos braços curtos dos cromossomos 3 e 8, observadas em tumores vesicais invasivos e de alto grau. As mais frequentes mutações em genes supressores de tumor compreendem mutações no gene *Rb* (gene do Retinoblastoma), identificadas em cerca de 30% dos casos e no gene *p53* que ocorre em mais de 50% dos carcinomas de células transicionais. Outras alterações moleculares associadas ao câncer de bexiga incluem a deleção e perda de expressão do gene *P16*; instabilidades de microsátélites; expressão aumentada dos oncogenes *c-erb-B2*, *CCND1* e *c-myc*; mutações no oncogene *H-ras*, identificada em mais de 35% dos tumores de bexiga; expressões anormais de receptores de fatores de crescimento no urotélio de pacientes com carcinoma de células transicionais; expressão reduzida da molécula de adesão E-caderina; alterações de fatores angiogênicos; entre outros (JUNG e MESSING 2000; HU et al. 2002; WILLIAMS e STEIN 2004).

O carcinoma de células transicionais da bexiga (também conhecido como carcinoma urotelial) é a segunda malignidade a afetar o trato genito-urinário e a segunda causa de morte entre os tumores com essa localização (WILLIAMS e STEIN 2004; HUSSAIN e JAMES 2005). Esse tipo tumoral compreende 90% das neoplasias de bexiga, em especial em países industrializados (PARKIN et al. 1999). Entre 70 e 80% dos pacientes com tumores primários de bexiga apresentam tumores superficiais, confinados à mucosa superficial, tendo a ressecção transuretral (acompanhada seletivamente de administração intra-vesical de imuno ou quimioterapia) como um método curativo para esses casos. Dentre os pacientes com tumores superficiais, cerca de 80% vão recidivar e destes, 10 a 30% apresentarão progressão da doença invasiva, a qual apresenta um mau prognóstico. Portanto, os

controles periódicos são necessários para que sejam detectados novos focos de câncer ainda em estágios iniciais. Além disso, 50% dos pacientes que apresentam desde o primeiro momento uma doença avançada e são tratados localmente apresentam recidiva nos dois anos seguintes ao tratamento e provavelmente irão morrer devido ao câncer de bexiga. (HOQUE et al. 2003; WILLIAMS e STEIN 2004; HUSSAIN e JAMES 2005).

É interessante notar que o câncer urotelial é único quando comparado aos carcinomas não-cutâneos por apresentar um estágio superficial que pode ser observado em exames visuais e identificado citologicamente e, portanto, diagnosticado, acompanhado e tratado nesta fase.

Há um conceito postulado de que existem duas vias distintas, mas que se sobrepõem em algumas etapas de aparecimento do câncer urotelial: a papilar e a não-papilar. Aproximadamente 80% deste tipo de câncer se apresentam como lesões papilares exfoliativas, que decorrem de epitélios hiperplásicos. Estes tumores tendem a recorrer e raramente evoluem para câncer invasivo de alto grau. O restante é não-papilar e invasivo ao diagnóstico e decorrente de displasia severa ou carcinoma *in situ*. A vasta maioria dos cânceres de bexiga invasivos ocorre em pacientes sem história prévia de tumores papilares (DINNEY et al. 2004).

Sendo uma das características marcantes desse tipo tumoral a freqüente taxa de recidivas, na maioria das vezes, em curtos espaços de tempo, a capacidade de prever o curso da doença (ou seja, a individualização do prognóstico) e a sua detecção precoce são fatores decisivos para o controle dessa patologia e para uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

As informações mais relevantes para a decisão do tratamento do tumor primário são características intrínsecas do tumor, principalmente o estadiamento TNM (“tumor-node-metastasis”; tumor-linfonodos-metástases) combinado com o grau tumoral (SOBIN e WITTEKIND 2004; BORDEN et al. 2005), juntamente com a profundidade de invasão, a extensão do acometimento vesical, a história pregressa de tumores vesicais e o grau de indiferenciação celular. Características clínicas do paciente como idade, estado geral, co-morbidades e preferências pessoais podem ser importantes na decisão terapêutica. É através da avaliação cuidadosa desses fatores que é feita a decisão por uma modalidade terapêutica isolada ou combinada para cada paciente. Nesse sentido, fatores prognósticos com maior sensibilidade e especificidade poderiam oferecer subsídios mais confiáveis para as decisões clínicas.

Atualmente, a citologia urinária e o exame histopatológico de biópsias da parede da bexiga obtidas durante a cistoscopia são testes de detecção mais eficazes. (SYRIGOS et al. 2004; BORDEN et al. 2005). A cistoscopia apresenta altas taxas de sensibilidade e especificidade (entre 70 e 80%) (SYRIGOS et al. 2004), mas apresenta dificuldade na identificação de lesões pré-neoplásicas, de carcinomas *in situ* sem grandes evidências macroscópicas e de lesões papilares pequenas. Além do alto custo e de ser um método invasivo, a realização periódica de exames de cistoscopia gera desconforto e as queixas mais comuns de pacientes submetidos a esse procedimento são dor, hematúria, constante anseio de urinar e infecção do trato urinário, dentre outros (VRIESEMA et al. 2000). A citologia, por sua vez, apesar de ser um método não invasivo e apresentar alta especificidade (quase 100%), apresenta baixa sensibilidade e pouca reprodutibilidade (SYRIGOS et al. 2004).

Devido à insatisfação diante dos métodos atuais de diagnóstico, tem sido utilizada a presença de diferentes marcadores no soro e na urina como fator de diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de câncer de bexiga, principalmente no caso de tumores superficiais. Eles incluem, por exemplo, citoqueratinas, ácido hialurônico e E-caderina solúvel. Dos marcadores citados, há alguns que vêm sendo bastante utilizados, no entanto, a sensibilidade e a especificidade apresentadas são extremamente baixas em tumores precoces (EPSTEIN et al. 1998). Portanto, há uma busca intensa para a obtenção de testes capazes de detectar a presença do câncer de bexiga de maneira eficiente e não invasiva. Exemplo dessa busca são os testes capazes de detectar a presença de células neoplásicas na urina, os quais facilitariam a detecção precoce e o acompanhamento freqüente da doença nos pacientes. Um exemplo de teste para detecção de câncer aprovado pelo departamento americano Food and Drug Administration-FDA como uma ferramenta para a ajuda para o diagnóstico inicial do câncer de bexiga é o UroVysion, o qual é um teste baseado em detecção de anormalidades cromossômicas através de hibridização *in situ*, ele apresenta sensibilidade de 68,6% e especificidade de 77,7% (RAMAKUMAR et al. 1999). Outros marcadores em potencial para prognóstico foram identificados, apresentando sensibilidades mais altas que a citologia urinária, no entanto as limitações para os seus usos na clínica são suas baixas especificidades. Como exemplos podemos incluir proteína nuclear de matriz 22 (NMP22) e telomerase (YANG et al. 1997; RAMAKUMAR et al. 1999; QUEK et al. 2004). Os principais métodos baseados em níveis de proteínas elevados ou alterados nas células tumorais têm como alvos: ácido hialurônico, antígeno Lewis X, produto de degradação do fibrinogênio, entre outros. Alterações genéticas detectadas

na urina de pacientes com tumores de bexiga incluem: mutações no gene *TP53*, perda de heterozigozidade e instabilidade de microssatélites (DEY 2004; HOQUE et al. 2006).

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

Existe uma necessidade de identificação dos pacientes com tumores com alto risco de progressão para que haja um melhor controle do câncer de bexiga. Ao mesmo tempo é preciso identificar os pacientes com baixo risco de recidivas e progressão tumoral para se evitar o tratamento excessivo destes. Uma vez que a quantidade de alterações genéticas observadas em tumores superficiais de bexiga é relativamente baixa quando comparadas às observadas nos tumores vesicais

invasivos, há um crescente interesse no estudo das alterações epigenéticas presentes na carcinogênese. Atualmente, a hipermetilação (ou metilação aberrante) de regiões promotoras de genes supressores de tumores são as alterações epigenéticas mais bem caracterizadas em neoplasias e têm sido descritas como marcadores em potencial para detecção e prognóstico de tumores (FRIEDRICH et al. 2005).

1.2 MARCADORES MOLECULARES E METILAÇÃO

Biomarcadores compreendem alterações celulares, bioquímicas e moleculares (proteômicas, genéticas e epigenéticas) pelas quais um processo biológico normal ou anormal pode ser reconhecido ou monitorado. Eles são usados para medir objetivamente e avaliar processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas. Na pesquisa e na detecção do câncer, um marcador refere-se a uma substância ou a um processo que seja indicativo da presença de neoplasia. Eles podem ser medidos em meios biológicos como tecidos, células ou fluídos corpóreos (sendo estes últimos os mais vantajosos, por serem mais acessíveis e aumentarem a possibilidade de triagem e minimização de custos) (VERMA et al. 2003; WAGNER et al. 2004).

Atualmente, a identificação de marcadores moleculares eficazes para o diagnóstico do câncer é uma área muito promissora de pesquisa em câncer. A carcinogênese é um processo de múltiplos passos acompanhado por um acúmulo de alterações, portanto as células neoplásicas apresentam características exclusivas ou mais frequentemente encontradas nelas do que em células normais. Essas características podem ser usadas como marcadores moleculares com capacidade de

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

Alterações epigenéticas são modificações do genoma transmitidas durante a divisão celular que não envolvem uma mudança na sequência de DNA. Elas podem gerar expressão alterada de genes, sem alterar a sequência de DNA. Características importantes das alterações epigenéticas são: a possibilidade de revertê-las, diferente das mutações genéticas; efeitos em grupos de genes localizados próximos no genoma; altas frequências de alterações (maiores que as frequências de mutações); seu status de poder ser modificado por fatores do ambiente. As alterações epigenéticas estão relacionadas ao envelhecimento da cromatina, considerando as modificações pós-traducionais das histonas, a organização dos nucleossomos, além de outras estruturas DNA-cromatina, também incluindo a metilação de citosinas no DNA (FEINBERG 2004).

Há diferenças importantes de metilação e cromatina que distinguem os gametas entre si e os diferentes tecidos durante o desenvolvimento. Após a fertilização, há uma onda de reorganização da maquinaria epigenética. Por exemplo:

durante a fertilização há uma hipometilação significativa, seguida de uma onda de reorganização da cromatina de maneira tecido-específica durante a implantação, incluindo a ocorrência de metilação de DNA como marca para determinados genes (FEINBERG 2004). A marca epigenética de um gene, baseada na sua origem parental, que resulta em expressão mono-alélica é chamada de “imprinting” genômico (FALLS et al. 1999).

A metilação do DNA é um processo biológico que consiste na ligação covalente de um radical metil (CH_3) principalmente nas bases nitrogenadas citosinas (C) que estão localizadas a 5' de guaninas (G). Esta ligação ocorre no carbono 5 das citosinas. Sequências repetitivas do dinucleotídeo CG presentes principalmente em regiões promotoras dos genes recebem a denominação de ilhas de CpG (HABUCHI et al. 2001). O critério para determinar se uma região é uma ilha de CpG é que ela seja maior que 200bp, tenha um conteúdo de C somado a G maior que 50% e que a proporção entre CG e GC seja maior que 60% (TOYOTA et al. 1999).

As enzimas que transferem o radical metil para a citosina são as DNA metiltransferases (DNMT). O alvo dessas enzimas é o dinucleotídeo CG. Ortólogos dessas enzimas não foram encontrados em organismos que não apresentam metilação como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. A metiltransferase de mamíferos, Dnmt1, tem alta afinidade por substratos hemimetilados, mas também é capaz de atuar na metilação de substratos não metilados, ou seja, metilação *de novo*. Essas atividades são desencadeadas por estruturas aberrantes de DNA, interações proteína-proteína e resíduos de citosinas metiladas presentes no DNA substrato. Os efeitos causados pela metilação de citosinas nas regiões promotoras sugerem que este mecanismo inibe a transcrição

gênica impedindo o seu início. Três possíveis mecanismos foram propostos para o efeito de repressão transcricional devido à metilação do DNA. O primeiro mecanismo envolve a interferência direta na ligação de fatores de transcrição aos seus locais de reconhecimento nos promotores gênicos, como se a presença do radical metil na seqüência impedisse os fatores de transcrição de se ligarem aos seus sítios específicos. Já foi mostrado que a metilação do DNA reduz a afinidade de ligação dos fatores de transcrição às suas seqüências alvo (JONES e LAIRD 1999). O segundo mecanismo em potencial seria através da ligação de repressores transcricionais específicos ao DNA metilado. O terceiro possível mecanismo pelo qual a metilação poderia reprimir a transcrição é pela alteração da estrutura da cromatina (SINGAL e GINDER 1999). Há um grupo de proteínas conhecidas como proteínas com domínio de ligação ao CpG metilado (MBD), que se ligam preferencialmente aos dinucleotídeos CG metilados. Essas proteínas reprimem a transcrição parcialmente através da ação de deacetilases de histonas (HDAC), enzimas que removem o grupo acetil das histonas permitindo assim, uma compactação da cromatina (ROUNTREE et al. 2001). Tem sido estudada a associação entre a atividade da maquinaria de metilação considerando a ação das proteínas da família das DNMT e das MBD com outro mecanismo epigenético: a acetilação de histonas considerando a ação das HDAC, criando uma cooperação desses mecanismos no silenciamento da transcrição de determinados genes.

O estabelecimento e manutenção dos padrões de metilação de uma determinada seqüência são feitos pelas DNMT. A replicação de uma seqüência metilada gera uma seqüência hemimetilada, pois uma fita permanece metilada enquanto a fita recém sintetizada não está metilada. As enzimas DNMT adicionam

um radical metil no dinucleotídeo CG complementar ao dinucleotídeo metilado da fita mãe (PLASS e SOLOWAY 2002).

A princípio, as alterações acumuladas durante a carcinogênese foram determinadas como sendo anormalidades genéticas progressivas, que incluem mutações em genes supressores de tumor e em oncogenes e ainda anormalidades cromossômicas. No entanto, há cada vez mais evidências de que alterações epigenéticas estão envolvidas no processo de aparecimento e progressão do câncer. Determinadas modificações epigenéticas ocorrem muito mais frequentemente em células neoplásicas do que em células normais das quais são derivadas. Apesar dos mecanismos destas modificações não serem totalmente esclarecidos, pode-se observar a crescente lista de genes supressores de tumor (e candidatos a genes supressores), envolvidos no sistema de reparo de DNA, no ciclo e morte celulares e genes que bloqueariam metástase, como os envolvidos em adesão celular, que têm sua expressão suprimida por estes mecanismos. A repressão transcricional observada está associada com metilação anormal (ou hipermetilação) de ilhas de CpG presentes nas regiões promotoras desses genes, locais normalmente não metilados em células normais. Através desse mecanismo de silenciamento, a expressão de genes supressores de tumor pode ser reduzida ou eliminada, portanto a hipermetilação aparece como um mecanismo alternativo à mutação (BAYLIN e OHM 2006).

A hipótese de Knudson de que dois eventos são necessários para a completa inativação de um gene supressor de tumor é fundamental na compreensão da carcinogênese. Os dois mecanismos propostos pelos quais os genes supressores de tumor são reprimidos são mutação e perda de material cromossômico. No entanto, o fato de a metilação de ilhas de CpG localizadas em promotores gênicos poder causar

silenciamento da transcrição, somado à observação de padrões alterados de metilação em células cancerosas, podem sugerir que esta seria uma via em potencial a ser acrescentada na teoria de Knudson para inativação de genes supressores de tumores (JONES e LAIRD 1999).

A ocorrência de metilação anormal ou hipermetilação tem sido considerada como um marcador em potencial para o câncer (HERMAN et al. 1998; ESTELLER et al. 1999; JONES e LAIRD 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000). Como a detecção de um marcador deve ocorrer, de preferência em um exame não invasivo, estudos também analisando fluidos corpóreos têm sido feitos (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; PALMISANO et al. 2000; ROSAS et al. 2001; DULAIMI et al. 2004; ROSENBAUM et al. 2005).

Os primeiros trabalhos avaliando o papel da hipermetilação da região promotora de um painel de genes em câncer de bexiga foram publicados no final de 2001 e início de 2002. MARUYAMA et al. (2001) analisaram o perfil de metilação nas regiões promotoras de um painel de dez genes (*RASSF1A*, *RAR β*, *APC*, *P 16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD*, *H-CAD* e *FHIT*) e estabeleceram uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *E-CAD* metilado e uma menor sobrevida. (CHAN et al. 2002) analisaram um painel de sete genes (*RARβ*, *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD* e *P15*) em tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras de urinas correspondentes aos tumores e demonstraram que a detecção pela urina é factível e, de acordo com os resultados obtidos, essa detecção é mais sensível do que a citologia convencional. Comparando a hipermetilação da região promotora do gene *P14* em amostras de tumores e de DNA de plasma correspondentes, DOMINGUEZ et al. (2002) encontraram 87% de

concordância e estabeleceram uma correlação significativa entre a metilação de *P14* e a presença de focos multicêntricos, tumores maiores e recidivas. Em outro estudo, TADA et al. (2002) analisaram a hipermetilação da região promotora de um painel de sete genes (*hMLH1*, *P16*, *DAPK*, *MGMT*, *GSTP1*, *E-CAD* e *VHL*) e demonstraram existir uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes que apresentavam o gene *DAPK* hipermetilado e maior frequência de recidiva.

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

DULAIMI et al. (2004) analisam tumores e amostras de urina de pacientes portadores de câncer de bexiga quanto a hipermetilação de cinco genes (*P16*, *P14*, *Rb*, *APC* e *RASSF1A*) em quarenta e cinco tumores de bexiga. Nesse trabalho, foi estabelecido que um painel contendo três genes (*P14*, *APC* e *RASSF1A*) se mostrava capaz de identificar todos os tumores, ou seja, todos os tumores apresentavam pelo menos um desses três genes metilados. O mesmo painel foi testado em amostras de urina correspondentes aos mesmos tumores e mostrou uma sensibilidade de 87% e 100% de especificidade. Nesse trabalho, 16% das amostras de urina em que foi possível detectar hipermetilação em um ou mais dos genes do painel tinham se apresentado como negativas na citologia urinária.

A técnica para a detecção de metilação utilizada nos trabalhos citados é a PCR específica para a detecção de metilação (MSP – “methylation specific PCR”)

(HERMAN et al. 1996). Esta técnica que facilitou a análise de um maior número de amostras em um tempo menor que as técnicas utilizadas anteriormente e com um custo menor. Ela é muito sensível, sendo capaz de detectar um alelo que apresenta metilação dentre mil que se apresentam não metilados (CAIRNS et al. 2001; ROSAS et al. 2001). A técnica é baseada em um primeiro passo no qual o DNA é submetido a um tratamento com bissulfito de sódio. Este tratamento converte as citosinas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. No momento da reação de amplificação as uracilas são convertidas em timinas. Na amplificação por MSP há dois diferentes pares de “primers”, cada par reconhece especificamente as seqüências metiladas (com as citosinas mantidas) ou as seqüências não metiladas (com timinas nos lugares das citosinas). O desenho dos “primers” é uma etapa importante, pois a confiabilidade desse método depende da escolha de regiões do promotor que contenham ilhas de CpG e que possam ser reconhecidas pelos “primers” quando estiverem metiladas.

Para o nosso trabalho realizado para a dissertação de Mestrado (OLIVEIRA 2003) foram escolhidos 11 genes (*DAPK*, *E-CAD*, *GSTP1*, *MGMT*, *P14*, *P16*, *RAR β* , *TIMP-3*, *14-3-3 σ* , *APC* e *H-CAD*), que já haviam sido descritos como freqüentemente silenciados devido à metilação de seus promotores em outros tipos de tumores. O objetivo daquele estudo foi investigar padrões de metilação destes genes em câncer de bexiga e correlacionar esses dados com parâmetros clínico-patológicos. Foi testada também a detecção de metilação em promotores gênicos em DNAs extraídos de amostras de urina através de PCR específica para a detecção de metilação (MSP). O padrão de metilação dos 11 genes foi determinado em 38 amostras de tumores de bexiga. Os DNAs foram extraídos de amostras emblocadas

em parafina e submetidos à MSP. As frequências de metilação encontradas nos tumores foram de: 68,4% para o gene *14-3-3σ*, 60,5% para o gene *RARβ*, 57,9% para o gene *APC*, 42,1% para o gene *E-CAD*, 13,2% para o gene *DAPK*, 10,5% para os genes *GSTP1*, *p14*, *p16* e *H-CAD*, 5,3% para o gene *MGMT* e 0% para o gene *TIMP-3*. A metilação do promotor do gene *E-CAD* foi correlacionada, com significância estatística, com a presença de metástases. A metilação do promotor do gene *APC* foi observada em tumores em estadios mais avançados e a metilação do promotor do gene *14-3-3σ* foi associada com o estágio mais avançado T1 quando comparado ao estágio menos avançado Ta. A detecção de metilação em promotores gênicos em DNAs extraídos de amostras de urina através de MSP foi factível. Os resultados trabalho de Mestrado sugeriram que, além de ser um fenômeno freqüente na carcinogênese nesse tipo de tumor, o perfil de metilação de determinados genes pode ser usado como marcador molecular em potencial para o câncer de bexiga. No entanto, estudos mais amplos são necessários para a confirmação dos achados deste trabalho.

A partir desses resultados, foi feita a opção de aumentar o número de amostras estudadas para a região promotora dos quatro genes mais freqüentemente metilados, para que os achados pudessem avaliados com maior confiabilidade. Portanto, o presente trabalho analisou o padrão de metilação da região promotora dos genes *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC* e *E-CAD* em 35 amostras adicionais de câncer de bexiga emblocadas em parafina (somando um total de 73 amostras), através da técnica de MSP convencional.

Recentemente, foi estabelecido um método de detecção de metilação dez vezes mais sensível que a MSP, portanto capaz de detectar um alelo que apresente

metilação dentre dez mil que se apresentem não metilados. Além disso, este método também permite uma quantificação dos níveis de metilação dos genes escolhidos, o que tem se mostrado extremamente relevante para a caracterização e distinção entre o tecido tumoral e o normal e também para correlação desses dados com parâmetros clínico-patológicos das amostras. Essa técnica é conhecida como MSP quantitativa (QMSP), MSP em tempo real ou *Methylight* (EADS et al. 2000). Uma outra vantagem a ser ressaltada é que ela dispensa a fase de eletroforese diminuindo o tempo de realização da técnica e evitando a manipulação de produtos amplificados. Além de um par de “primers”, esta técnica utiliza uma sonda marcada com fluoróforos, portanto contempla mais dinucleotídeos CG do que a MSP convencional, uma vez que esta sonda também apresenta CGs em sua seqüência.

Muitos estudos têm utilizado a QMSP para avaliar a região promotora de diversos genes em diferentes tipos tumorais. Um exemplo de um estudo pioneiro na utilização desta técnica com resultados importantes para a distinção de tecido normal e tumoral é o estudo em que HARDEN et al. (2003) avaliaram a hipermetilação da região promotora do gene *GSTP1* em trinta amostras de adenocarcinomas de próstata utilizando MSP quantitativa em tempo real e mostraram que esta técnica é capaz de distinguir amostras de tecido prostático benigno e adenocarcinoma de próstata com sensibilidade de 73% e especificidade de 100%, mesmo em amostras limitadas de tecido. Os dados encontrados sugerem que esta técnica é adequada para a detecção eficiente de um marcador diagnóstico em potencial para esse tipo de tumor.

Utilizando a técnica de QMSP, FRIEDRICH et al. (2004) analisaram o status de metilação de regiões promotoras de 12 genes associados com apoptose (*P14*, *FADD*, *TNFSF21*, *BAX*, *LITAF*, *DAPK*, *TMS-1*, *BCL2*, *RASSF1A*, *TERT*, *TNFSF25* e

EDNRB) em dezoito linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga, 127 tumores de bexiga, 37 amostras normais de bexiga e 37 amostras de urina de pacientes com câncer vesical. O grupo observou associação estatisticamente significativa da metilação na região promotora de *BCL2* com grau e estágio tumoral e das regiões promotoras de *P14* e *RASSF1A* apenas com estágio tumoral e ainda a metilação dos promotores de *TERT* e *EDNRB* foi identificada como preditoras do grau tumoral. O mesmo grupo, em 2006 (FRIEDRICH et al. 2006), avaliou o valor prognóstico da hipermetilação em 20 genes associados com câncer (*P14*, *P16*, *STAT-1*, *SOCS-1*, *DR-3*, *DR-6*, *PIG-7*, *BCL-2*, *H-TERT*, *BAX*, *EDNRB*, *DAPK*, *RASSF1A*, *FADD*, *TMS-1*, *E-CAD*, *ICAM-1*, *TIMP-3*, *MLH-1*, *COX-2*) em 105 tumores de câncer de bexiga não invasivo. Neste trabalho, foram identificados seis genes (*SOCS-1*, *STAT-1*, *BCL-2*, *DAPK*, *TIMP-3*, *E-CAD*), nos quais a presença de metilação estava associada com recidiva tumoral. Adicionalmente, a metilação de *TIMP-3* foi capaz de prever uma maior sobrevida livre de doença. YATES et al. (2006) analisaram a hipermetilação da região promotora de 8 genes (*DAPK*, *RASSF1A*, *E-CAD*, *RAR β* , *P14*, *P16*, *GSTP1* e *APC*) em 35 amostras de urinas de pacientes com câncer de bexiga, 35 de controles normais com idade acima de 70 anos e 34 de controles normais com idades abaixo de 40 anos. Eles observaram maiores frequências de metilação no grupo de pacientes que nos grupos controles e um menor índice de metilação no grupo de controles abaixo de quarenta anos e puderam concluir, portanto, que a frequência e a extensão de metilação aumenta com a idade e com a presença da malignidade. HOQUE et al. (2006) analisaram o status de nove (*RASSF1A*, *APC*, *E-CAD*, *RAR β* , *P14*, *P16*, *GSTP1*, *MGMT* e *TIMP-3*) promotores gênicos em amostras de tumores vesicais pareadas com amostras de urinas de 15

pacientes pela técnica de QMSP. Adicionalmente foram testadas nesse estudo 160 amostras de urinas de pacientes portadores de câncer de bexiga em diversos estádios e 94 amostras de controles sem evidência de câncer genito-urinário. Nos casos pareados, o perfil de metilação observado nas urinas foi correspondente ao observado nos tumores. Considerando apenas quatro genes (*PI4*, *PI6*, *GSTP1* e *MGMT*), 69% das amostras mostraram metilação em pelo menos um destes genes, para os quais todos os controles foram negativos, correspondendo a 100% de especificidade.

Os dados obtidos nos trabalhos citados acima apóiam a potencialidade do uso de hipermetilação de promotores gênicos no diagnóstico e para a prever o prognóstico de pacientes portadores de câncer de bexiga, com a vantagem dos testes serem factíveis em urina.

Em vista das vantagens relacionadas ao uso da técnica de QMSP, na segunda fase do nosso trabalho, com objetivo de estabelecer o padrão de metilação de genes pouco ou nunca estudados em tumores de bexiga, foram escolhidos outros genes para serem avaliados em amostras de bexiga tanto tumorais quanto normais. Esses genes foram avaliados através da técnica de QMSP. Apesar de haver diversos trabalhos analisando padrões de metilação de um painel de genes em tumores de bexiga, não há ainda marcadores bem estabelecidos com capacidade de detectar a doença precocemente apresentando sensibilidade e especificidade adequadas para o seu uso na rotina clínica e também marcadores capazes de prever o curso da doença e indicar, por exemplo, os casos que irão progredir. Portanto há a necessidade de estudar novos candidatos a marcadores neste tipo tumoral.

Levantando a hipótese da utilização da hipermetilação de promotores de genes alvos como potenciais marcadores moleculares para o câncer de bexiga, o

presente trabalho buscou avaliar a frequência de hipermetilação na região promotora de diversos genes para encontrar possíveis candidatos a marcadores moleculares para diagnóstico e acompanhamento de pacientes portadores de câncer de bexiga.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- 1) Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *E-CAD*, *RAR β* , *14-3-3 σ* , e *APC* através de PCR (convencional) específica para a detecção de metilação em 35 tumores de bexiga e agregar os dados encontrados com os dados obtidos durante o Mestrado para serem analisados em conjunto;
- 2) Correlacionar os dados clínico-patológicos dos pacientes com os padrões de metilação das regiões promotoras dos genes estudados;

- 3) Avaliar o nível de metilação da região promotora de genes adicionais em amostras tumorais e normais de bexiga através de PCR específica para a detecção de metilação em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa específica para a detecção de metilação (QMSP);
- 4) Correlacionar os dados clínico-patológicos do segundo grupo de pacientes com os padrões de metilação das regiões promotoras dos genes escolhidos para serem estudados através da técnica de QMSP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE TUMORES E LINHAGENS CELULARES

Cinco linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga foram utilizadas neste trabalho: HT-1376, J82, SW780 e T24 (derivadas de carcinoma de células transicionais da bexiga) e SCABER (derivada de carcinoma de células escamosas), obtidas da *American Type Culture Collection-ATCC* e cultivadas nos meios recomendados e em estufas úmidas a 37°C com 5% de CO₂.

As 35 amostras de tumores utilizadas na primeira parte do trabalho foram amostras emblocadas em parafina provenientes do arquivo do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer AC Camargo - SP. Foi feita uma busca casos seqüenciais diagnosticados como câncer de bexiga no período de 1995 a 1998, para permitir a posterior correlação dos achados moleculares com as dados clínico-patológicos. As lâminas coradas por hematoxilina-eosina foram analisadas por dois patologistas (Prof^o Dr. Fernando Soares e Dr. Antonio Hugo Campos) para confirmação de diagnóstico, estadiamento do tumor e determinação das áreas que correspondem a tecido tumoral, a fim de selecionar estas áreas para a extração de DNA com a menor proporção possível de tecido normal. Após essa determinação, os blocos correspondentes às lâminas foram seccionados com espessura de 5µm e em torno de 10 cortes foram utilizados para a extração do DNA. Adicionalmente, foi feita pelos patologistas a determinação das áreas que correspondem a tecido tumoral (uma área que apresentasse no mínimo 70% de tecido tumoral), a fim de selecionar

estas áreas para a extração de DNA com a menor proporção possível de tecido normal.

Na segunda parte do trabalho, foram analisadas 103 amostras de tumores de bexiga de pacientes atendidos no departamento de Urologia do Johns Hopkins Hospital em Baltimore, Maryland, Estados Unidos e 15 provenientes de pacientes atendidos no Departamento de Urologia do M. D. Anderson Cancer Center, Texas, Estados Unidos. A maioria das amostras normais foi proveniente do epitélio de bexigas normais retiradas durante autópsias realizadas no Johns Hopkins Hospital. Adicionalmente, foram utilizadas amostras de tecido normal de regiões sem indicação de malignidade em bexigas de pacientes com tumores focais atendidos na mesma instituição. Após a verificação pelos patologistas Dra. Shahnaz Begum e Dr. William M. Westra do Departamento de Patologia do Johns Hopkins Hospital, os blocos correspondentes às lâminas foram cortados com espessura de 12 μ m e em torno de 8 cortes foram utilizados para a extração do DNA.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído das linhagens celulares pela técnica de digestão com proteinase K seguida da técnica de extração por Fenol - Clorofórmio (FONG et al. 1994) com modificações incorporadas.

Para a extração de DNA das amostras dos tumores emblocados em parafina utilizadas na primeira parte foi utilizado o kit *Nucleon HT* (Amersham Life Sciences), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Esse método de extração se mostrou muito eficiente e prático, apresentando um rendimento satisfatório para esse tipo de

material. Resumidamente, essa extração consiste em uma primeira fase de desparafinização (com xilol), uma segunda fase de digestão do tecido (com a enzima Proteinase K), uma terceira fase de desproteinização (com uma solução de perclorato de sódio), uma quarta fase de extração do DNA (com clorofórmio), seguida de uma precipitação do DNA (com etanol absoluto) e subsequente lavagem (com etanol a 70%).

As lâminas correspondentes aos tumores da segunda parte do trabalho contendo os cortes de 12 μ m de amostra emblocada em parafina foram incubadas a 65°C durante dez minutos para o início da fase de desparafinização (sem xilol) e em seguida, são mergulhadas em detergente (Clear Rite, Richard Allan Scientific) para a total remoção da parafina que contorna e envolve as amostras. Em seguida as lâminas são banhadas em água destilada para remoção dos resíduos que não contêm tecidos. Em seguida, ocorre a microdissecção manual seguindo a lâmina corada com HE fornecida pelo patologista. A segunda fase consiste na digestão do tecido (com a enzima Proteinase K), seguida da extração do DNA (com fenol-clorofórmio), seguida de uma precipitação do DNA (com etanol absoluto) e subsequente lavagem (com etanol a 70%) (FONG et al. 1994).

3.3 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

O DNA é submetido a um tratamento de bissulfito de sódio e subsequente PCR MSP conforme descrito por HERMAN et al. (1996), incorporando algumas modificações. Este tratamento converte as citosinas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. No momento da PCR as uracilas são

convertidas em timinas. Na amplificação por PCR há dois diferentes pares de “primers”, cada par reconhece especificamente as seqüências metiladas (com as citosinas mantidas em suas posições originais) ou as seqüências não metiladas (com timinas nos lugares das citosinas).

Resumidamente, o tratamento de bissulfito de sódio envolve inicialmente a desnaturação do DNA genômico por incubação com NaOH 0.2M por 10 minutos a 37°C. Adiciona-se hidroquinona 10mM e bissulfito de sódio 3M pH 5.0 e a solução é incubada por 16 horas a 50°C. O DNA tratado é purificado pelo kit *Wizard DNA Clean-up System* (Promega) e dessulfonado com NaOH 0.3M e, em seguida é precipitado com etanol, ressuspenso em água destilada e deionizada e estocado a -70°C até o uso.

O protocolo do tratamento de bissulfito de sódio utilizado na primeira parte do trabalho consiste em:

- 1) Uma primeira etapa de desnaturação do DNA (1µg de DNA):
 - a) Tratar com 1µL de NaOH (0,2M);
 - b) Completar para um volume final de 50µL com água destilada autoclavada);
 - c) Incubar por dez minutos a 37°C.
- 2) Uma segunda etapa de tratamento com o bissulfito de sódio:
 - a) Adicionar 10µL de hidroquinona (10mM);
 - b) Adicionar 520µL de bissulfito de sódio (3M pH 5,0);
 - c) Adicionar 1µL DNA de esperma de Salmão ou de Arenque (20mg/mL);
 - d) Incubar a 50°C por 16 horas;

- e) Adicionar 1mL de resina (Wizard® DNA Clean-up Resin - utilização do kit Wizard® DNA Clean-up System, PROMEGA);
 - f) Homogeneizar por inversão por 5 minutos;
 - g) Passar a resina com o DNA ligado por uma coluna;
 - h) Lavar a coluna com 2mL de isopropanol 80%;
 - i) Centrifugar a coluna conectada a um novo tubo por 2 minutos a 14.000 rpm, para secar a resina;
 - j) Transferir a coluna para um novo tubo e eluir adicionando 50µL de água pré-aquecida (65-70°C);
 - k) Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente;
 - l) Centrifugar por 1 minuto a 14.000 rpm;
 - m) Descartar a coluna;
 - n) Incubar a -20°C por 6 horas;
 - o) Adicionar 1,5 µL de NaOH (10M).
- 3) Uma terceira etapa de precipitação do DNA:
- a) Incubar à temperatura ambiente por 5 minutos;
 - b) Adicionar 5µL de acetato de sódio (3M, pH 6,0) e 110µL de etanol 100%;
 - c) Adicionar 5µL de glicogênio (20mg/mL);
 - d) Manter por 16-20 horas a -20°C;
 - e) Em seguida, centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 14.000rpm;
 - f) Secar o precipitado;
 - g) Ressuspender em 25µL de água;
 - h) Armazenar a -20°C até o uso.

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

Na segunda parte do trabalho foi utilizado um tratamento de bissulfito de sódio incorporando algumas modificações, que tornaram o protocolo mais rápido, mantendo a mesma eficiência (JERÓNIMO et al. 2001). A principal diferença está no tempo de incubação do DNA com o bissulfito de sódio, que foi reduzido de 16 para 3 horas.

Resumidamente, o tratamento de bissulfito de sódio consiste em desnaturação de 2 μ g de DNA genômico por incubação com NaOH 0.2M por 20 minutos a 50°C. Esse DNA desnaturado é então diluído em 500 μ L de uma solução de hidroquinona 10mM e bissulfito de sódio 3M e é incubado por 3 horas a 50°C, no escuro. O DNA tratado é purificado pelo kit *Wizard DNA Clean-up System* (Promega) e dessulfonado com NaOH 0.3M e, em seguida é precipitado com etanol, ressuspendido em água destilada e deionizada e estocado a -70°C até o uso.

3.4 REAÇÃO DE PCR - MSP

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

As seqüências dos “primers” para a região promotora do gene *E-CAD* foram obtidas de ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. (2001), as seqüências para o gene *RARβ* de UEKI et al. (2000), as do gene *14-3-3σ* de FERGUSON et al. (2000) e as do gene *APC* de ESTELLER et al. (2000) (Quadro 1).

As reações de PCR foram realizadas com o kit *AmpliTaq GOLD* conforme instruções do fabricante (*Applied Biosystems*). Para a detecção dos produtos amplificados, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata (SANGUINETTI et al. 1994).

Quadro 1 - Seqüência dos “primers” utilizados na MSP.

Gene	Seqüências dos “primers” para a situação metilada (5’- 3’)	Seqüências dos “primers” para a situação não metilada (5’- 3’)
<i>RARβ</i>	D ^a GGATTGGGATGTCGAGAAC R ^b TACAAAAAACCTTCCGAATACG	D AGGATTGGGATGTTGAGAATG R TTACAAAAAACCTTCCAAATACA
<i>E-CAD</i>	D TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT R TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	D TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT R CACAACCAATCAACAACACA
<i>14-3-3σ</i>	D TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC R CCTCTAACCGCCCACCACG	D ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT R CCCTCTAACCCACCACACA
<i>APC</i>	D TATTGTGGAGTGGGGGTC R TGCACGAACTCCCGACGA	D GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT R CCAATCAACAAACTCCCAACAA

^a“Primer” direto, ^b“Primer” reverso

Condições da reação de amplificação:

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

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

3.5 TRATAMENTO DE LINHAGENS CELULARES COM 5-AZA CDR (EXTRAÇÃO DE DNA E RNA)

Com o objetivo de investigar se a metilação no gene 14-3-3 σ , que foi o gene mais freqüentemente encontrado metilado na primeira fase desse estudo, estaria relacionada ao silenciamento desse gene em linhagens celulares e tumores, experimentos adicionais foram realizados.

O tratamento *in vitro* de linhagens celulares com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza CDR) (SIGMA), o qual é uma agente desmetilante, foi feito como descrito anteriormente (FERGUSON et al. 2000). Resumidamente, duas linhagens celulares (J82 e SCABER) foram semeadas com a densidade de 2×10^5 células e foram cultivadas na presença (1, 5 e 10 μ M) ou na ausência da droga durante quatro dias. O meio foi trocado todos os dias. Foram extraídos DNA e RNA de aproximadamente

10⁶ células usando Trizol (Invitrogen) para a extração de RNA e o kit Wizard Genomic DNA purification (Promega) para a extração de DNA.

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

Para avaliar a qualidade do RNA, verificou-se a contaminação com DNA por PCR utilizando “primers” (direto 5'-TTGTGTCTCTAGTTCTGG-3' e reverso 5'-CAT TGTTGTAGTAGCTCTGC-3') desenhados nos íntrons 12 e 13 do gene *hMLH1* (*humam mut-L homologue 1*). As seguintes condições de amplificação foram utilizadas: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,3μM de cada “primer”, 1X tampão de reação da *AmpliTaq GOLD* e 1,5u de *AmpliTaq GOLD* (*Applied Biosystems*). O programa da PCR apresenta dez minutos iniciais a 95°C para a ativação da enzima *AmpliTaq GOLD*, dez ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos com a temperatura de 62° e 45 segundos a 72°C, dez ciclos com 30 segundos a 95° C, 45 segundos com a temperatura de 60° e 45 segundos a 72°C, quinze ciclos com 30 segundos a 95°C, 45 segundos com a temperatura de 58°C e 45 segundos a 72°C, 7 minutos a 72°C e 4°C infinito.

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

Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 μg de RNA total, 0.5 μg de “primer” (oligo(dT)₁₈) 1μL de dNTPs (10mM) e água ("RNase-free") até 11μL. A mistura foi incubada a 65°C durante 5 minutos e armazenada em gelo. Em seguida,

foram adicionados 4 μ L de Tampão para síntese da primeira fita 5X, 2 μ L de DTT 0,1M, 200u de *RNase out* e 40u da enzima *SuperScriptII* (*Life Technologies-Invitrogen*). A reação seguiu com incubação a 42°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos.

3.6 RT-PCR QUALITATIVA DE *14-3-3 σ*

A concentração do RNA foi determinada por espectrofotometria e também foi utilizada eletroforese em gel de agarose para confirmar a integridade e a quantidade do RNA. O RNA total foi tratado com DNase I (Ambion) e o cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total após o tratamento, utilizando o kit da *Superscript II* e “primers” oligo-d(T) (Invitrogen).

As seqüências dos “primers” para a detecção de expressão de *14-3-3 σ* foram descritos por FERGUSON et al. (2000) (direto 5' – GTGTGTCCCCAGAGCCATGG – 3' e reverso 5' – ACCTTCTCCCGTACTCACG – 3') e formam um produto de 279 pares de base. Para controle da integridade do RNA, foi realizada a amplificação de um gene dito constitutivo *ACTNI* utilizando os “primers” direto 5' – CTG GAG CGG ACC GAG AAA CT – 3' e reverso 5' – TCC TGA GGC GTG ATG GTT GT – 3', os quais produzem um fragmento de 308 pares de base. A reação de amplificação (volume final de 25 μ L) contém 1,25 unidades de Platinum Taq Polimerase (Invitrogen), 1X tampão 10X, 1,5mM MgCl₂, 200 μ M de dNTP e 15pmol de cada “primer” e tem como molde 5 μ L de cDNA (diluído dez vezes). As condições de amplificação utilizadas consistiram em 2 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguida por 35

ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 60°C e extensão a 72°C por um minuto e uma extensão final de 5 minutos. Os produtos da reação são visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.7 RT-PCR DE 14-3-3 σ EM TEMPO REAL

A RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando o sistema *SYBR® green I* (SIGMA) de detecção no termociclador *LightCycler™* (Roche Diagnostics). As reações de PCR foram padronizadas para a amplificação de um produto único e específico. A temperatura de detecção da fluorescência foi estabelecida entre a temperatura de desnaturação (*melting*) de qualquer dímero de “primer” formado e a temperatura de desnaturação do produto esperado (no caso 72°C). As reações de amplificação contêm 2 μ L de cDNA (diluído dez vezes) como molde em um volume final de 20 μ L, contendo 1,25 unidades de Platinum Taq Polimerase (Invitrogen), 1X tampão 10X, 2,0mM MgCl₂, 200 μ M de dNTP, 15pmol de cada “primer”, 5% de DMSO (Sigma), 0,5 μ L de BSA (10mg/mL – Promega) e 0,2 μ L de SYBR Green I (1:100). Os experimentos foram realizados em duplicatas. As condições de amplificação utilizadas consistiram em 2 minutos de desnaturação inicial a 95°C, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por quinze segundos, 20 segundos a 64°C e extensão a 72°C por 20 segundos. Para confirmar que o produto formado é o desejado, os produtos de PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose e a uma análise de curva de desnaturação no fim de cada reação resfriando as amostras a 65°C e aumentando a temperatura para 95°C a 0,1°C/s, com aquisição contínua da fluorescência.

A expressão relativa de $14\text{-}3\text{-}3\sigma$ foi calculada utilizando o método de comparação de CT (threshold cycle ou ciclo limite). Resumidamente, ele envolve a comparação dos entre os valores de CT das amostras de interesse em relação a um controle (no nosso caso um *pool* (uma mistura) de bexiga normal – *BD-Biosciences*). Os valores de CT tanto das amostras quanto do controle são normalizados utilizando-se um gene constitutivo (*ACTNI*). Esse método de comparação de CTs é conhecido como método $2^{-[\Delta\Delta CT]}$, no qual $[\Delta\Delta CT] = \Delta CT_{\text{amostra}} - \Delta CT_{\text{referência}}$, sendo que $\Delta CT_{\text{amostra}}$ é o valor de CT para a determinada amostra normalizada com o gene constitutivo e $\Delta CT_{\text{referência}}$ é o valor de CT para o controle também normalizado com o gene constitutivo (LIVAK e SCHMITTGEN 2001).

3.8 REAÇÃO DE MSP QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (QMSP)

Os DNAs são amplificados através de uma PCR em tempo real específica para a detecção de metilação (QMSP) como descrita anteriormente (HARDEN et al. 2003). Resumidamente, após o tratamento com bissulfito de sódio, o DNA é amplificado utilizando “primers” específicos para a região desejada, os quais flanqueiam uma sonda fluorogênica de hibridização marcada com um corante “reporter”, ou seja, emissor de fluorescência a 5’ (FAM – 6-carboxi-fluoresceína) e a 3’ um corante “quencher”, ou seja receptor (TAMRA – tetrametil-rodamina). A atividade endonucleásica de 5’ para 3’ da enzima Taq DNA polimerase cliva a sonda durante a fase de extensão e libera o “repórter”, cuja fluorescência é detectada pelo laser. Após a fluorescência ultrapassar o limiar de detecção, a amplificação da PCR

resulta em um sinal de fluorescência proporcional a quantidade de produto de PCR gerado.

Condições da reação de amplificação:

- a) 0,2mM de dNTPs;
- b) 0,6 μ M de “primer” direto;
- c) 0,6 μ M de “primer” reverso;
- d) 0,2 μ M de sonda;
- e) 0,75U de *Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen)*;
- f) 5,5mM de MgCl₂ (*Applied Biosystems*);
- g) 16,6mM de sulfato de amônia;
- h) 67mM Trizma (ph 8,8);
- i) 10mM mercaptoetanol;
- j) 200nM of ROX Dye reference (*Invitrogen*);
- k) 0,1% DMSO (dimetil sulfóxido).

Totalizando 17,0 μ L, aos quais são adicionados 3,0 μ L de DNA previamente tratado com bissulfito de sódio.

As reações foram realizadas em placas de 384 posições no “7900 Sequence detector System” (*Perkin-Elmer Applied Biosystems*). Cada placa era composta de amostras de pacientes em triplicata e no mínimo seis controles negativos com água no lugar do molde, assim como controles positivos. DNA de leucócitos de indivíduos saudáveis foram metilados *in vitro* com excesso de SssI metiltransferase (New England Biolabs Inc) , seguindo as instruções do fabricante, para a geração de uma curva padrão. A curva padrão tem o intuito de calibrar e equiparar as placas e é

constituída de seis pontos de diluições seriadas, feitas de 10 em 10 vezes desse DNA 100% metilado, partindo de 90ng e chegando até 0,0009ng.

Além dos genes de interesse, também são desenhados “primers” e sonda para uma região sem o dinucleotídeos CG do gene *β-actina* para funcionar como referência interna, controlando assim a quantidade de DNA colocada na reação. São feitas razões entre as médias das triplicatas do gene alvo e este valor é dividido pelo valor da média das triplicatas da amostra em questão para a *β-actina* e este valor é multiplicado por mil e esta razão será o resultado final para cada gene em cada amostra.

Todas as reações foram realizadas nas condições: 95 °C por 3 minutos seguidos de 50 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda a análise estatística da primeira parte do trabalho foi realizada com o programa estatístico *SPSS* versão 10.0 pelo Dr. André Lopes Carvalho, do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo - SP.

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

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

A análise estatística da segunda parte do trabalho foi realizada pela Dra. Marianna Zahurak do Departamento de Bioestatística/Oncologia da Escola de Medicina da Johns Hopkins.

O principal foco deste estudo foi a comparação entre os níveis de metilação de genes em amostras de câncer de bexiga.

A associação da presença ou ausência de metilação com câncer foi avaliada usando “cross tabulation” e o teste de associação pelo Qui-quadrado ou Fisher. As diferenças foram consideradas significativas quando o p for menor que 0,05. Os níveis contínuos de metilação foram avaliados usando regressão logística (COX 1970) e curvas ROC (“receiver operating characteristic”).

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

Esse índice foi calculado para cada caso através da fórmula:

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

Os índices de metilação foram comparados com os parâmetros: idade, estadio e grau através de análise de modelos de variância.

A presença ou ausência de metilação também foi avaliada em associação com sobrevida, a distribuição dos eventos no tempo, usando o método de Kaplan Meier e comparados utilizando log-rank ou modelos de regressão de risco proporcional.

O sistema Statistical Analysis System-SAS foi utilizado para as análises (SAS Institute Inc 1999) ou o sistema R (R Development Core Team 2004).

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS DE TUMORES DE BEXIGA DE PACIENTES ATENDIDOS NO CENTRO DE TRATAMENTO E PESQUISA HOSPITAL A. C. CAMARGO

Os resultados desta primeira parte compreendem a análise da metilação dos genes *14-3-3 σ* , *RARB*, *APC* e *E-CAD* nas amostras do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo e foram realizadas no Brasil. Os resultados das trinta e cinco amostras serão mostrados e analisados juntamente com os resultados das 38 amostras analisadas durante o trabalho de mestrado, pois o intuito da utilização destas amostras foi atingir um número adequado para a análise estatística comparando os achados moleculares e os parâmetros clínico-patológicos.

No total, foram processadas 88 amostras de tumores de bexiga emblocadas em parafina e destas foi possível obter DNA de boa qualidade em 73 amostras. A forma não metilada dos genes foi detectada em todas as amostras tumorais, o que era esperado uma vez que havia a presença de tecido normal devido à microdissecção macroscópica realizada.

A Tabela 1 resume as características clínico patológicas dos pacientes do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo incluídos neste estudo. A caracterização da população demonstra a proporção esperada entre homens e mulheres, que é de aproximadamente três homens para cada mulher com câncer de bexiga. Na população em foco, são observados cinquenta e cinco homens e dezoito

mulheres, ou seja, uma proporção de 3,06:1. Observa-se, ainda, que o câncer de bexiga é mais incidente em pessoas idosas, sendo que na população estudada 56,2% dos pacientes foram diagnosticados com idade acima de sessenta e cinco anos. A maioria dos pacientes era tabagista (67,1%). (Tabela 1).

No conjunto estudado, a principal terapia utilizada foi a cirurgia, estando incluídas: biópsia, ressecção transuretral, cistostectomia e cistoprostatectomia. Em termos de estadiamento, baseando-se na classificação TNM, 61,6% dos pacientes apresentaram tumores em estadio 1 e destes 60% eram Ta (superficial). Os diagnósticos mais frequentes foram: carcinoma urotelial invasor (38,4%) seguido de carcinoma urotelial papilar de alto grau (27,4%) e de carcinoma urotelial papilar de baixo grau (26%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros clínico-patológicos das amostras tumorais do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo.

Variável	Frequências n° (%)
Sexo	
Masculino	55 (75,3)
Feminino	18 (24,7)
Idade (anos)	
Maior ou igual a 60	41 (56,2)
Menor que 60	32 (43,8)
Estadio TNM	
1	45 (61,6)
2, 3 e 4	27 (37,0)
Desconhecido	1 (1,4)
Estadio 1	
Ta	27 (60,0)
T1	18 (40,0)
Acometimento de Linfonodos	
N0	61 (83,6)
N+	7 (9,6)
Desconhecido	5 (6,8)
Diagnóstico	
NUPBPM ^a	6 (8,2)
CUPBG ^b	19 (26,0)
CUPAG ^c	20 (27,4)
CUI ^d	28 (38,4)
Invasão Linfática	
Não	46 (63,0)
Sim	15 (20,5)
Desconhecido	12 (16,4)
Metástase	
Não	72 (98,6)
Sim	1 (1,4)
Tabagismo	
Não	20 (27,4)
Sim	49 (67,1)
Desconhecido	4 (5,5)
Total	73 (100)

^a NUPBPM Neoplasia urotelial papilar de baixo potencial maligno

^b CUPBG Carcinoma urotelial papilar de baixo grau

^c CUPAG Carcinoma urotelial papilar de alto grau

^d CUI Carcinoma urotelial invasor

4.2 PERFIL DE METILAÇÃO DOS GENES *14-3-3 σ* , *RARB*, *APC* E *E-CAD* DOS TUMORES ESTUDADOS

As condições de reações de MSP utilizadas para os quatro genes estudados foram descritas anteriormente nos Materiais e Métodos. Para estas reações, houve sempre três temperaturas de anelamento, a primeira mais alta mantida nos dez primeiros ciclos, uma temperatura de dois graus a menos nos seguintes dez ciclos e uma última temperatura menor em dois graus para os últimos quinze ciclos (Quadro 2). Essa variação decrescente de temperatura é conhecida como “touchdown” e foi a condição que gerou resultados mais satisfatórios no momento da padronização.

Quadro 2 - Condições padronizadas durante o mestrado para a MSP.

Gene	Temperaturas da PCR*	Tamanho do amplicon (bp)
<i>RARB</i>	58 - 56 - 54	M - 100 U - 100
<i>E-CAD</i>	58 - 56 - 54	M - 115 U - 97
<i>14-3-3σ</i>	66 - 64 - 62	M - 105 U - 107
<i>APC</i>	62 - 60 - 58	M - 98 U - 108

M = produto obtido da amplificação com os “primers” desenhados para as seqüências metiladas.

U = produto obtido da amplificação com os “primers” desenhados para as seqüências não metiladas.

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

O perfil de metilação (detecção da presença de alelos metilados ou não-metilados) da região promotora dos quatro genes incluídos neste estudo foi analisado em cinco diferentes linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga (SW 780, T

24, HT-1376, J82 e SCABER) (Figura 1). A Figura 1 mostra que o gene *RARβ* se apresentou metilado em quatro linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga, enquanto os genes *E-CAD*, *14-3-3σ* e *APC* se apresentaram metilados em duas destas linhagens celulares.

Linhagem	<i>14-3-3σ</i>	<i>RARβ</i>	<i>APC</i>	<i>E-CAD</i>
SCABER				
HT 1376				
T24				
SW 780				
J82				

Legenda: Caixas pretas, amostras que apresentaram metilação. Caixas brancas, amostras que não mostraram metilação.

Figura 1 - Perfil de metilação da região promotora dos genes *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC* e *E-CAD* em de linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga.

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

Linhagens celulares são amplamente utilizadas em diferentes tipos de pesquisas sobre o câncer, incluindo estudos sobre hipermetilação de promotores gênicos. No entanto, já se sabe que os resultados obtidos com experimentos que utilizam linhagens celulares de tumores não refletem necessariamente a realidade

biológica dos tumores dos pacientes. SMIRAGLIA et al. (2001) mostraram que linhagens celulares derivadas de diversos tipos de câncer exibem níveis significativamente maiores de hipermetilação nas ilhas de CpG que amostras de tumores das quais elas foram derivadas.

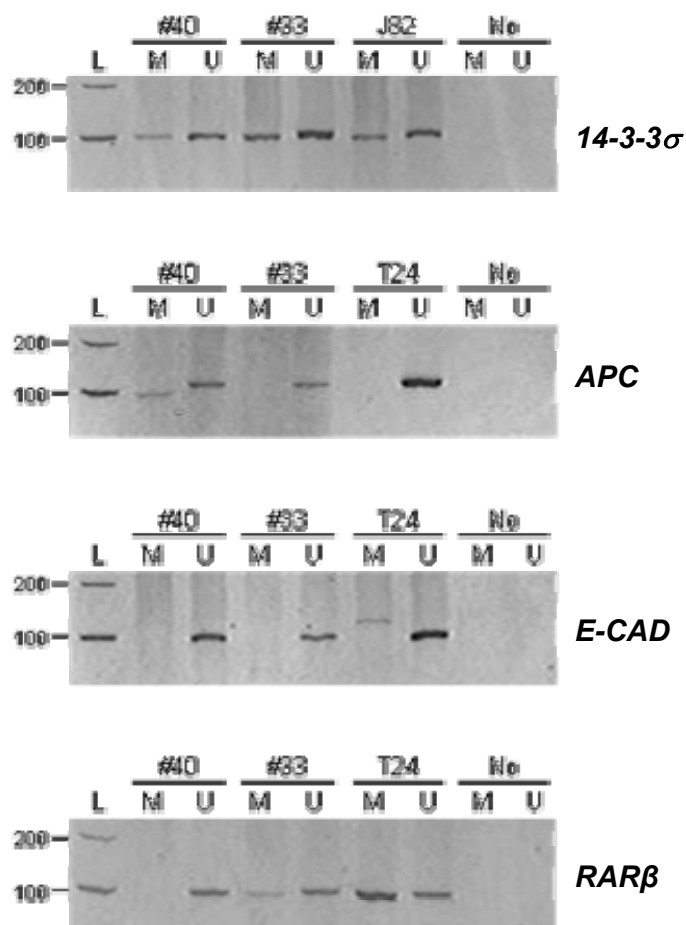
Conhecendo o padrão de metilação das linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga disponíveis, pudemos usá-las como controles positivos e negativos para as reações de MSP feitas com os DNAs provenientes de amostras de tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga.

Em relação às 73 amostras tumorais estudadas, as frequências observadas de metilação foram: 71,2% (52 amostras) para *14-3-3σ*, 58,9% (43) para *APC*, 49,3% (36) para *RARβ* e 28,8% (21) para *E-CAD*. Considerando os quatro genes em conjunto, 90,4% das amostras apresentaram metilação em pelo menos um dos genes estudados (Tabela 2). A forma não metilada dos genes foi detectada em todas as amostras tumorais, o que era esperado uma vez que havia a presença de tecido normal devido à microdissecção macroscópica realizada. A Figura 2 mostra resultados representativos de reações de MSP para cada um dos quatro genes com algumas amostras estudadas.

Tabela 2 – Frequência de metilação dos genes *14-3-3σ*, *RARβ*, *APC* e *E-CAD* nas amostras de pacientes portadores de câncer de bexiga atendidos no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A. C. Camargo.

GENE	FREQÜÊNCIA DE METILAÇÃO
	N (%)
<i>14-3-3σ</i>	52 (71,2)
<i>APC</i>	43 (58,9)
<i>RARβ</i>	36 (49,3)
<i>E-CAD</i>	21 (28,8)
Total	73 (100)

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



Legenda: Os DNAs foram extraídos das amostras de tumores e das linhagens e submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio e em seguida foram realizadas reações de MSP com “primers” específicos para a situação não-metilada (U) e específicos para a situação metilada (M). Os produtos de cada reação foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8%. Os códigos dos pacientes estão indicados. As linhagens celulares J82 e T24 (controles positivos) também estão indicados. L, marcador de peso molecular “100bp DNA Ladder” (*Invitrogen*). No, controle negativo da PCR (sem DNA).

Figura 2 – Resultados representativos de reações de MSP para os genes *14-3-3 σ* , *APC*, *E-CAD* e *RAR β* .

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DOS GENES *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* E *E-CAD* E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS

O *status* de metilação de cada um dos genes estudados foi correlacionado com parâmetros clínico-patológicos como: idade, gênero, classificação TNM, tabagismo e invasão linfática. Não houve associação estatisticamente significativa entre os dados moleculares e as características dos pacientes. Também houve a tentativa de analisar os genes em conjunto em relação aos parâmetros disponíveis, no entanto não houve correlações estatisticamente significativas.

4.4 EFEITO DA METILAÇÃO SOBRE A EXPRESSÃO DE *14-3-3 σ*

Para investigar se a hipermetilação de *14-3-3 σ* encontrada neste trabalho em linhagens celulares assim como em tumores de bexiga contribui para a perda de expressão deste gene, foram escolhidas duas linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga: uma metilada (J82) e uma não metilada (SCABER) para serem tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxycitidina (5-Aza-dCR). Se a metilação participar no silenciamento deste gene, o tratamento da linhagem metilada (J82) deve aumentar ou restabelecer a expressão de *14-3-3 σ* . A expressão de mRNA foi comparada antes e depois do tratamento com 5-Aza-dCR por RT-PCR qualitativa e também em tempo real.

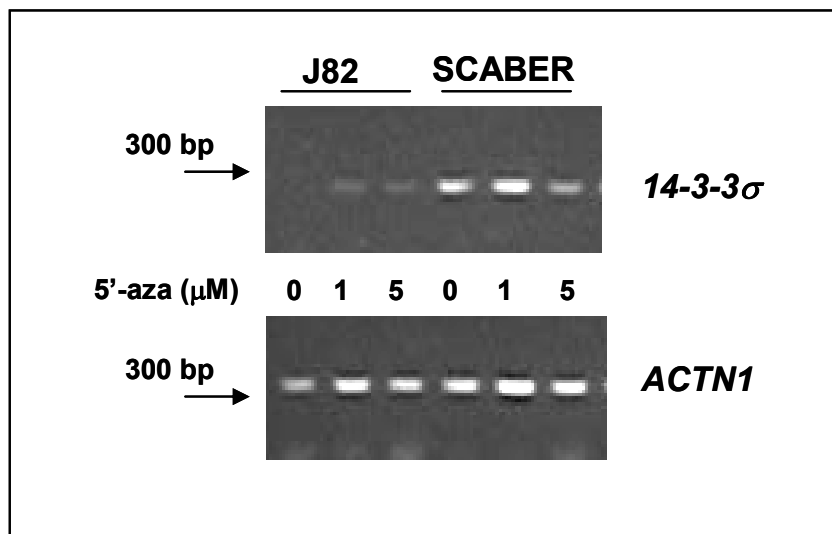
Depois do tratamento com a droga 5-Aza-dCR a expressão de *14-3-3 σ* , antes indetectável por RT-PCR qualitativa na linhagem J82, tornou-se detectável,

sugerindo o restabelecimento da expressão (Figura 3A). Também através de MSP, foi possível observar uma redução da metilação (Figura 3B). Outro dado interessante observado foi a reativação da expressão de *14-3-3 σ* de maneira dose dependente, conforme o aumento da concentração da droga adicionada às linhagens celulares, foi possível observar um restabelecimento maior quantitativamente (Figura 3C).

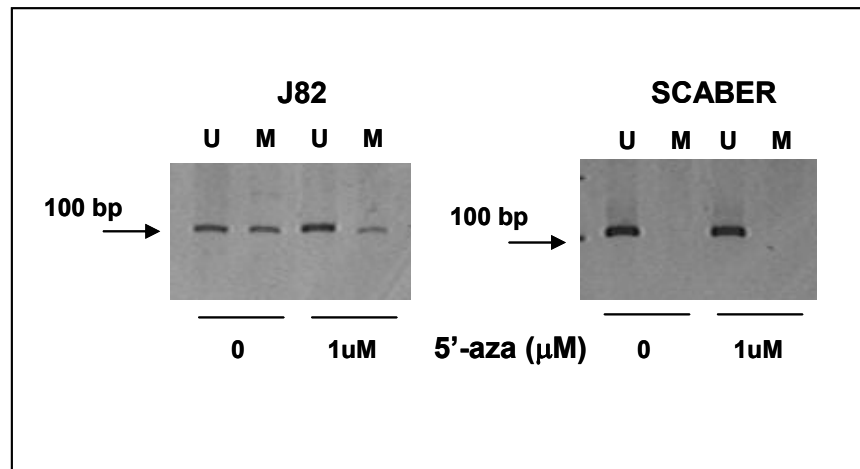
Já na linhagem SCABER, o tratamento não produziu nenhum efeito na expressão de *14-3-3 σ* (Figuras 3A e B).

Portanto, os dados aqui apresentados sugerem que a metilação de *14-3-3 σ* detectada nas linhagens está correlacionada com a perda de expressão.

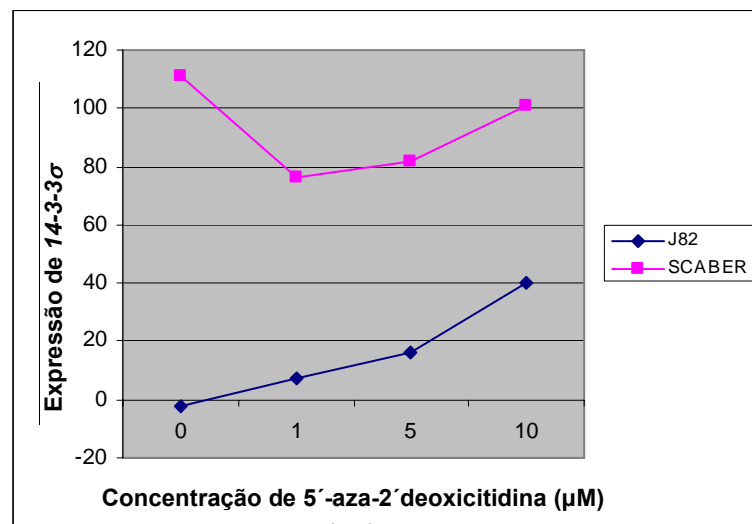
A.



B.



C.



Legenda: A - RT-PCR qualitativa mostrando a expressão de *14-3-3σ* e *ACTN1* das linhagens J82 e SCABER antes e depois do tratamento com 5-Aza-dCR (os números representam os dias de tratamento);

B – MSP das linhagens celulares J82 e SCABER. Depois do tratamento com 5-Aza-dCR, o DNA foi extraído das linhagens e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio e em seguida foram realizadas reações de MSP com “primers” específicos para a situação não-metilada (U) e específicos para a situação metilada (M). Os produtos de cada reação foram aplicados em gel de poliacrilamida a 8%;

C – RT-PCR em tempo real mostrando a expressão relativa de *14-3-3σ*, normalizada por *ACTB1*, relativa ao “pool” de bexigas normais e calculada pelo método $2^{-[\Delta\Delta CT]}$, durante o tratamento com 5-Aza-dCR com as linhagens J82 e SCABER, comparando a expressão antes e depois do tratamento.

Figura 3 - A expressão de *14-3-3σ* em nível de mRNA aumenta quando a linhagem celular J82 é tratada com 5-Aza-dCR.

4.5 GENES SELECIONADOS PARA A ANÁLISE COM A TÉCNICA DE MSP QUANTITATIVA (QMSP)

Na segunda fase do trabalho, com objetivo de estabelecer o padrão de metilação de genes adicionais aos já previamente estudados em tumores de bexiga, foram escolhidos 21 genes para serem avaliados em amostras de bexiga tanto tumorais quanto normais. Os genes escolhidos compreendem $14-3-3\sigma$, *CTNNB1*, *CALCA*, *hMLH1*, *PGP9.5*, *DAPK*, *CCND2*, *HIC1*, *AIM1*, *DCC*, *MINT1*, *MINT31*, *FANC-F*, *TGF- β 2*, *ATM*, *CRBP*, *THBS1*, *CCNA1*, *ESR*, *FHIT* e *MT1G*. Esses genes foram avaliados através da técnica de QMSP em amostras de tumores de bexiga e amostras normais. Esta parte do trabalho foi realizada em Baltimore, Maryland nos Estados Unidos, no laboratório chefiado pelo Dr. David Sidransky na “Johns Hopkins Medical Institutions”.

Primeiramente, foram aleatoriamente escolhidas 25 amostras de tumores de bexiga e 5 amostras de tecido de bexiga normal para compor o que foi chamado de grupo de avaliação, o que significa que essas amostras foram utilizadas para uma primeira seleção dos genes. Nestas amostras, realizamos as reações para todos os 21 genes e a partir deste resultado (Tabela 3), selecionamos sete genes que mostraram resultados mais promissores para serem estudados no “validation set” ou grupo de validação, o qual continha 93 amostras tumorais e 26 normais. No grupo de validação não foram incluídas as amostras utilizadas no grupo de treinamento, pois isso daria um viés aos resultados. Esse teste preliminar em um grupo com um número menor de amostras tem como objetivo se obter uma avaliação inicial dos genes escolhido, necessária para que amostras de difícil obtenção sejam utilizadas

somente com genes que se mostrem mais promissores nos testes iniciais. O que se busca inicialmente são genes que apresentem maiores frequências de metilação em tumores e menores frequências em amostras normais. Esses genes serão então testados em um grupo maior e diferente do inicial, havendo assim também a possibilidade de haver correlação dos achados moleculares com os parâmetros clínico-patológicos, uma vez que tendo uma maior amostragem é mais realista tentar estabelecer correlações estatisticamente significativas.

Quadro 3 - Seqüência dos “primers” e sondas utilizados na QMSP

GENE	Direto 5'-3' (“primer”)	Sonda 5'-3' (6-FAM-5'- 3'-6-TAMRA)	Reverso 5'-3' (“primer”)
<i>β-actina</i>	TGGTGATGGAGGAGTTTAGTAAGT	ACCACCACCAACACACAATAACAAACACA	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
<i>AIM1</i>	CGCGGGTATTGGATGTTAGT	GGGAGCGTTGCGGATTATTCGTAG	CCGACCACCTATACGAAAA
<i>CALCA</i>	GTTTTGGAAGTATGAGGGTGACG	ATCCGCCAATACACAACAACCAATAAACG	TCCCCCGCTATAAATCG
<i>CCNA1</i>	TCGCGCGAGTTTATTCG	CGTTATGGCGATGCGGTTTCGG	CCGACCAGCAAAACG
<i>CCND2</i>	TTTGATTAAAGGATGCGTTAGAGTACG	AATCCGCCAACACGATCGACCCTA	ACTTTCTCCCTAAAAACCGACTACG
<i>DCC</i>	TTGTTCGCGATTTTGGTTTC	GCGCTAAACAAAAAACTCCGAAAA	ACCGATTACTTAAAAATACGCG
<i>ESR</i>	GGCGTTCGTTTGGGATTG	CGATAAAACCGAACGACCCGACGA	GCCGACACGCGAACTCTAA
<i>HIC1</i>	GTTAGCGGTTAGGGCGTC	CAACATCGTCTACCCAACACTCTCCTACG	CCGGGCGCCTCCATCGTGT
<i>MINT1</i>	ATTTTCGAAGCGTTTGGTTGGC	GCGAAACTCCCCTACTCTCCAAC	ACAAAAACCTCAACCCCGC
<i>MINT31</i>	GAGTGATTTATTAGGTTTCGTC	ACGCCGAAAAAACTTCCCAAC	CGAAAAACGAAACGCCGCGA
<i>CRBP</i>	CTGGGAATCCAGCTGTCGCCGCCCGCA	GACCCGAAAAATAAACGCCCTCCGAAAAA	GCGCATCATAGCCATCAGCAACAAA
<i>PGP9.5</i>	CGGCGAGTGAGATTGTAAGGTT	TTCGGTCGTATTATTTCGCGTTGCGTAC	GAACGATCGCGACCAATAAATAC
<i>DAPK</i>	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGGTTGG	CCCTCCAAACGCCGA
<i>FHIT</i>	GGGCGCGGGTTGGGTTTTTAC	AACGACGCCGACCCACTAACTCC	GAAACAAAAACCCACGCCCGC
<i>FANC-F</i>	TTTTTCGTTTTTGGGAGAATCGGGTTTTT	ACGTCCCGAACGCCGAACCGAAAAAAATTA	ATACACCGCAAACCGCGACGAACAAAACG
<i>hMLH1</i>	CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT	CGGACGTCAAACGCCACTACG	CTATCGCGCCTCATCGT
<i>THBS1</i>	CGACGCACCAACCTACCG	ACGCCGCGTCACCTCCCT	GTTTTGAGTTGGTTTACGTTTCGTT
<i>14-3-3σ</i>	GAAGGTTAAGTTGGTAGAGTAGGTCGAAC	CTCGCCTTCTCCACGACGCC	AACTACTAAAAACAAATTCGCTCTTCG
<i>CTNNB1</i>	GGAAGGCGCGTCGAGT	CGCGCGTTTCCCGAACCG	TCCCCTATCCAAACCCG
<i>MT1G</i>	TGCGAAAGGGGTCGTTTTGC	GCGATCCCGACCTAACTATACG	GCGATCCCGACCTAACTATACG
<i>ATM</i>	CGGGTCGAATGTTTTGGGG	ATCCAATATCACGCGATCTCCGC	GCAAAACAGATATACCCATAC
<i>TGFβR2</i>	GAGGGGAGGCGGTAGAT	CGACGTCCAACCCTAACTCTC	CAACTCAACTCAACGCTACG

Tabela 3 – Frequência de metilação dos 21 genes nas amostras de tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras normais de bexiga, utilizados na segunda parte (atendidos no hospital Johns Hopkins).

GENE	TUMORES	NORMAIS
	N (%)	N (%)
<i>CCNA1</i>	14 (56)	0 (0)
<i>MINT1</i>	14 (56)	0 (0)
<i>CRBP</i>	12 (48)	0 (0)
<i>CCND2</i>	18 (72)	1 (20)
<i>PGP9.5</i>	23 (92)	2 (40)
<i>CALCA</i>	22 (88)	2 (40)
<i>AIM1</i>	18 (72)	2 (40)
<i>DAPK</i>	7 (28)	0 (0)
<i>DCC</i>	6 (24)	0 (0)
<i>MINT 31</i>	5 (20)	0 (0)
<i>FHIT</i>	3 (12)	0 (0)
<i>ATM</i>	1 (4)	0 (0)
<i>FANC-F</i>	0 (0)	0 (0)
<i>TGFβ2</i>	0 (0)	0 (0)
<i>hMLH1</i>	0 (0)	0 (0)
<i>ESR</i>	11 (44)	1 (20)
<i>MT1G</i>	5 (20)	1 (20)
<i>THBS1</i>	1 (4)	1 (20)
<i>CTNNB1</i>	0 (0)	1 (20)
<i>HIC1</i>	25 (100)	3 (60)
<i>14-3-3σ</i>	25 (100)	5 (100)
Total	25 (100)	5 (100)

No grupo de validação, vários genes se mostraram com altas frequências de metilação em amostras tumorais e baixas nas amostras normais. Os genes

selecionados para serem testados nas 93 amostras tumorais e 26 normais incluídas no grupo de validação foram: *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNAI* e os resultados se encontram na Tabela 4. Para esta análise foi realizada somente uma avaliação qualitativa dos dados, isto é, qualquer metilação acima de zero está sendo considerada como positiva, independente dos níveis de metilação. Para os genes *MINT1* e *CCNAI*, observamos ausência de metilação em amostras normais e observamos uma frequência de 31,18% e 56,99%, respectivamente, nos tumores analisados. Para o gene *CRBP*, a frequência de metilação encontrada foi de 38,71% em tumores e 3,85% em amostras normais. Para o gene *CALCA*, as amostras tumorais apresentaram metilação em 64,52% dos casos e as normais em 15,38%. Para os genes *PGP9.5* e *CCND2*, as amostras normais mostraram 19,23% de frequência de metilação, enquanto os tumores mostraram 70,97% e 56,99%, respectivamente de metilação. A frequência de metilação dos tumores para o gene *AIM1* foi de 83,87% em amostras tumorais e de 26,92% (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência de metilação dos genes *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNAI* nas amostras de tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras normais de bexiga (de pacientes atendidos no hospital Johns Hopkins ou no MD Anderson) do grupo de validação.

GENE	TUMORES	NORMAIS
	N (%)	N (%)
<i>CCNAI</i>	53 (56,99)	0 (0)
<i>MINT1</i>	29 (31,18)	0 (0)
<i>CRBP</i>	36 (38,71)	1 (3,85)
<i>CALCA</i>	60 (64,52)	4 (15,38)
<i>PGP9.5</i>	66 (70,97)	5 (19,23)
<i>CCND2</i>	53 (56,99)	5 (19,23)
<i>AIM1</i>	78 (83,87)	7 (26,92)
Total	93 (100)	26 (100)

É esperado que marcadores moleculares sejam capazes de distinguir amostras tumorais de amostras normais, portanto uma situação ideal teria uma alteração freqüente em tumores e ausente ou muito pouco freqüente em amostras normais. Considerando este critério, analisando os dados mostrados na Tabela 4 é possível afirmar que os genes *CCNA1*, *MINT1* e *CRBP* mostraram os melhores resultados uma vez que os dois primeiros não foram positivos em amostras normais e o gene *CRBP* se mostrou positivo em apenas uma, o que representou menos de 4% das amostras normais incluídas no estudo. Além disso, a freqüência de metilação desses genes detectada nos tumores foi relativamente alta (acima de 30%).

Sendo a QMSP uma metodologia quantitativa, dados adicionais podem ser gerados levando em conta os níveis de metilação. Para isso, há a possibilidade de selecionar um valor de corte (“cutoff value”) para determinar quais amostras são consideradas positivas e quais são negativas. Neste caso, cria-se um valor de corte intuitivo, o que representa o valor que parece ser o mais apropriado numa análise visual dos dados, valor esse que pareça melhor diferenciar as amostras normais das tumorais. Esta estratégia é bastante criticada, pois não há critérios pré-estabelecidos para a determinação deste valor e pequenas variações nestes critérios podem influenciar as freqüências encontradas e, portanto poderiam prejudicar a reprodutibilidade dos dados gerados.

Como exemplo, colocamos os valores das amostras analisadas para o gene *PGP9.5* transformando-os em valores logarítmicos em um gráfico de dispersão para que seja possível a visualização dos dados e a decisão do valor de corte. Cada círculo representa uma amostra. É importante lembrar que, como os valores são logarítmicos, os valores iguais a zero são omitidos no gráfico (Figura 4).

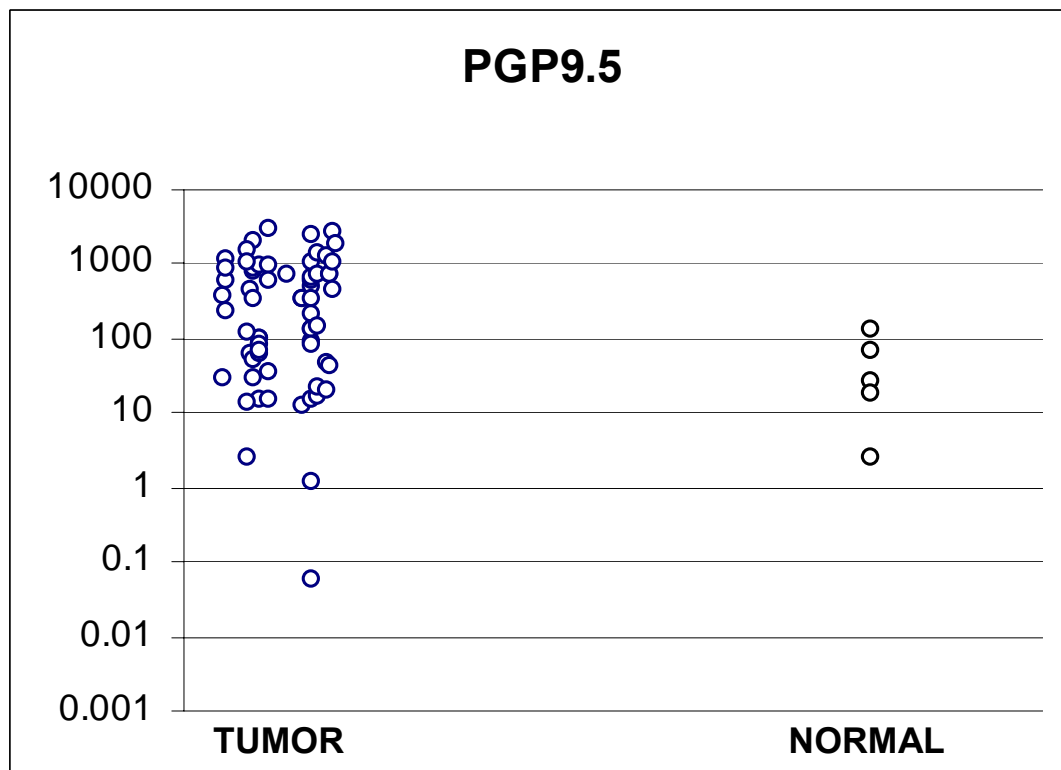


Figura 4 - Gráfico demonstrativo de dispersão em escala logarítmica que expõe as razões obtidas para o gene *PGP9.5* (normalizado com β -actina) para as amostras normais e de tumores de bexiga do conjunto de validação.

Se escolhêssemos um valor de corte de 131 (somente acima desse valor as amostras seriam consideradas positivas) para o gene *PGP9.5*, as frequências de metilação mudariam, a dos tumores antes de 70,97% passaria para 41,93% e dos normais se tornaria 0% (antes 19,23%), resultados que tornariam esse gene mais atrativo como marcador molecular.

Em um outro caso, como no exemplo do gene *CRBP* (Figura 5), em que apenas uma amostra mostra valor acima de zero, é difícil decidir qual seria o melhor valor de corte. Portanto há a tentativa de utilização de ferramentas estatísticas para a avaliação dos melhores valores (níveis de metilação) a serem utilizados para distinguir amostras normais de neoplásicas. Uma tentativa de utilizar os valores de

sensibilidade e especificidade de cada gene para a análise dos valores será mostrada no item 4.7 abaixo.

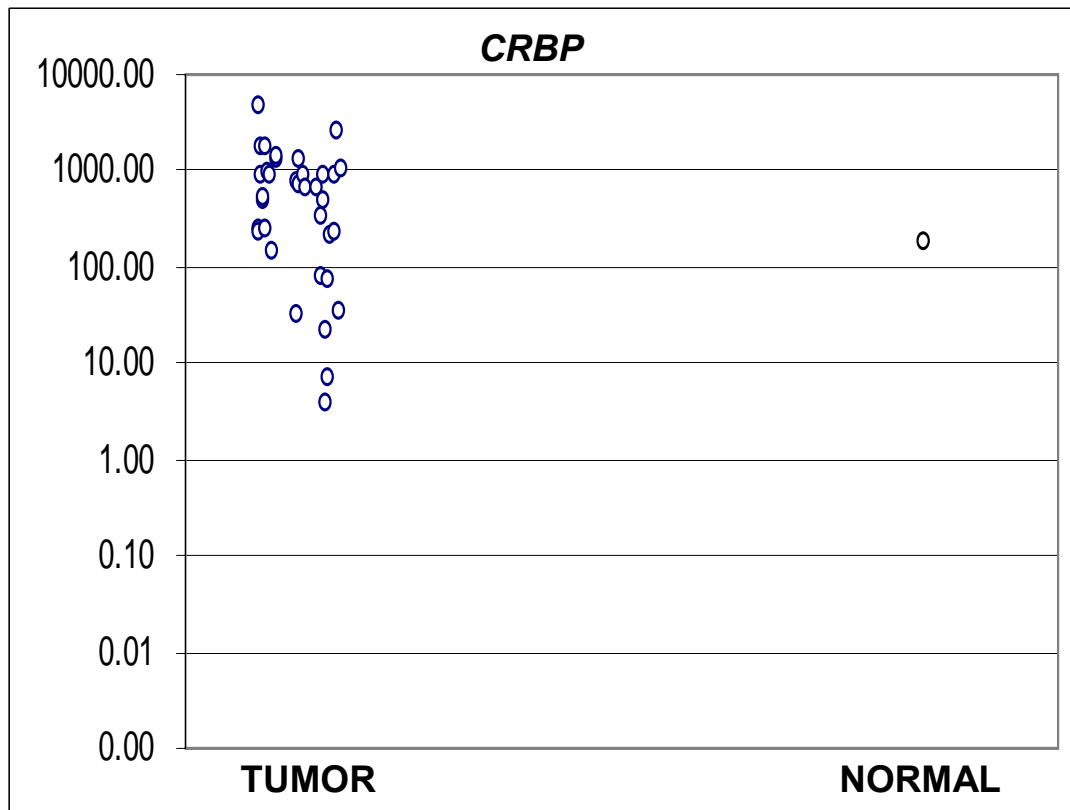


Figura 5. Gráfico de dispersão em escala logarítmica demonstrativo que expõe as razões obtidas para o gene *CRBP* (normalizado com β -actina) para as amostras normais e de tumores de bexiga do conjunto de validação.

4.6 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO GRUPO DE VALIDAÇÃO

Para o conjunto de validação, foram analisadas 78 amostras de tumores de bexiga de pacientes atendidos no departamento de Urologia do Johns Hopkins Hospital em Baltimore, Maryland, Estados Unidos e 15 provenientes de pacientes atendidos no Departamento de Urologia do M. D. Anderson Cancer Center, Texas,

Estados Unidos. As amostras provenientes do M. D. Anderson foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bogdan A. Czerniak. A maioria das amostras normais foi proveniente do epitélio de bexigas normais retiradas durante autópsias realizadas no Johns Hopkins Hospital. Algumas amostras foram colhidas de regiões sem indicação de malignidade em bexigas de pacientes com tumores focais atendidos na mesma instituição.

A proporção entre homens e mulheres neste grupo de pacientes foi de 4,17 e a maioria dos pacientes tinha acima de 65 anos (51,3%). Considerando os três estádios clínicos, a amostragem estava bem distribuída entre os três. Quase 90% dos pacientes apresentaram tumores de alto grau. Como esperado, a maioria não desenvolveu metástases. Não houve informação para 57% dos pacientes em relação ao tabagismo.

Tabela 5 - Parâmetros clínico-patológicos das amostras tumorais do conjunto de validação (pacientes atendidos no Hospital Johns Hopkins ou MD Anderson).

Variável	Frequências n° (%)
Sexo	
Masculino	75 (80,7)
Feminino	18 (19,3)
Idade (anos)	
Maior ou igual a 65	61 (51,3)
Menor que 65	32 (48,7)
Estadio TNM	
Ta	17 (18,3)
Tis	13 (14,0)
T1	32 (34,4)
T2	7 (7,5)
T3 e T4	24 (25,8)
Estadio Clínico	
1 (Ta e Tis)	30 (32,3)
2 (T1)	32 (34,4)
3 (T2, T3 e T4)	31 (33,3)
Grau	
Alto	82 (88,2)
Baixo	11 (11,8)
Recidiva	
Não	38 (40,9)
Sim	31 (33,3)
Desconhecido	24 (25,8)
Metástase	
Não	61 (65,6)
Sim	14 (15,0)
Desconhecido	18 (19,4)
Tabagismo	
Não	7 (7,5)
Sim	33 (35,5)
Desconhecido	53 (57,0)
Total	93 (100)

4.7 CORRELAÇÃO ENTRE A METILAÇÃO DOS GENES *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1* E OS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS AMOSTRAS

O conjunto de validação apresentou 93 amostras de tumores de bexiga e 26 amostras normais de bexiga. Idade, gênero e raça foram comparadas entre os grupos. A variável raça não se mostrou diferente entre os grupos: 86% dos pacientes portadores de tumores se declararam brancos e 84% no grupo de pacientes sem indicação de malignidade genito-urinária. Já para as variáveis idade e gênero, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas. O grupo de tumores era composto de 80% de homens em comparação com apenas 54% dos normais, $p = 0,008$. A idade média dos pacientes com câncer foi de 65 anos, enquanto que a dos pacientes sem câncer foi de 53 anos, $p = 0,0007$. A metilação nos 7 genes analisados se mostrou positivamente correlacionada de maneira significativa, usando o coeficiente de correlação de Pearson (Quadro 4).

Quadro 4 – Valores dos coeficientes de correlação de Pearson dos genes *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1*, analisando as amostras do grupo de validação.

GENES	<i>CCND2</i>	<i>PGP9.5</i>	<i>CRBP</i>	<i>CCNA1</i>	<i>CALCA</i>	<i>AIM1</i>	<i>MINT1</i>
<i>CCND2</i>	—	0,604 p <0,0001	0,643 p <0,0001	0,446 p <0,0001	0,445 p <0,0001	0,349 p =0,0001	0,659 p <0,0001
<i>PGP9.5</i>	0,604 p <0,0001	—	0,505 p <0,0001	0,483 p <0,0001	0,474 p <0,0001	0,411 p <0,0001	0,559 p <0,0001
<i>CRBP</i>	0,643 p <0,0001	0,505 p <0,0001	—	0,421 p <0,0001	0,450 p <0,0001	0,329 p =0,0003	0,532 p <0,0001
<i>CCNA1</i>	0,446 p <0,0001	0,483 p <0,0001	0,421 p <0,0001	—	0,514 p <0,0001	0,444 p <0,0001	0,463 p <0,0001
<i>CALCA</i>	0,445 p <0,0001	0,474 p <0,0001	0,450 p <0,0001	0,514 p <0,0001	—	0,452 p <0,0001	0,556 p <0,0001
<i>AIM1</i>	0,349 p =0,0001	0,411 p <0,0001	0,329 p =0,0003	0,444 p <0,0001	0,452 p <0,0001	—	0,415 p <0,0001
<i>MINT1</i>	0,659 p <0,0001	0,559 p <0,0001	0,532 p <0,0001	0,463 p <0,0001	0,556 p <0,0001	0,415 p <0,0001	—

Para esta análise, qualquer valor acima de zero foi considerado como positivo para as amostras. Para todos os genes, as “cross-tabulations”; teste do qui-quadrado entre presença e ausência de metilação e presença ou ausência de câncer mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre a presença de metilação e presença de câncer: *CCND2* $p = 0,0007$, *PGP9.5* $p <0,0001$, *CRBP* $p = 0,0007$, *CCNA1* $p <0,0001$, *CALCA* $p <0,0001$, *AIM1* $p <0,0001$ e *MINT1* $p = 0,0011$. Estes resultados mostram que a metilação nesses genes distingue as amostras normais das

tumorais, uma vez que é mais provável que uma amostra tumoral seja metilada e que uma amostra normal não o seja.

A especificidade e sensibilidade para cada gene estão demonstradas no Quadro 5. A especificidade desses genes para a identificação da presença de câncer variou de 73 a 100%, enquanto a sensibilidade variou de 31 a 71%. Usando a presença de metilação em qualquer um dos dois genes que apresentaram 100% de especificidade (*CCNA1* e *MINT1*) para prever o tipo de tecido, a sensibilidade resultante é de 62,7% (58/93).

Quadro 5 – Valores de especificidade e sensibilidade dos genes *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1*, analisando as amostras do grupo de validação.

GENE	ESPECIFICIDADE (%)	SENSIBILIDADE (%)
<i>CCNA1</i>	100,0	57,0
<i>MINT1</i>	100,0	31,2
<i>CRBP</i>	96,2	38,7
<i>CALCA</i>	84,6	64,5
<i>PGP9.5</i>	80,8	71,0
<i>CCND2</i>	80,8	57,0
<i>AIM1</i>	73,1	83,9

Pacientes com 65 anos ou mais apresentaram mais freqüentemente a presença de metilação nos genes *CCNA1* ($p = 0,0039$), *PGP9.5* ($p = 0,0045$) e *CCND2* ($p = 0,0214$). Metilação em *CALCA* ($p = 0,0005$) e *AIM1* ($p = 0,0429$) está associada com estádios mais avançados e em *CRBP* está significativamente associada com tumores de alto grau ($p = 0,0317$).

A média dos índices de metilação dos sete genes estudados, que reflete a relação entre o número de genes metilados e o número de genes analisados, foi

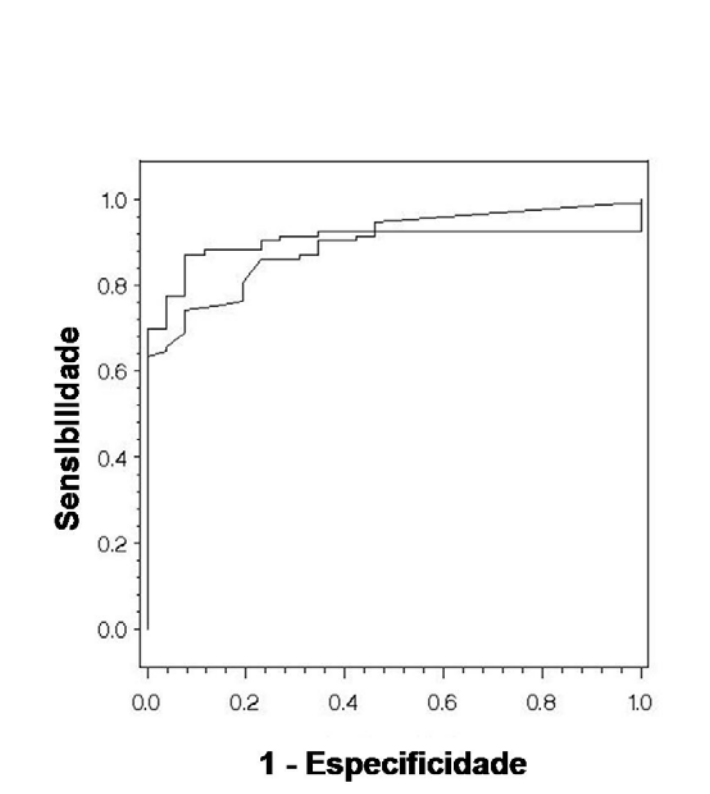
significativamente maior em pacientes com 65 anos ou mais, 3,67 (95% CI- intervalo de confiança: 3,16;4,18) comparado com o grupo mais jovem, 2,56 (95% CI: 2,0;3,1), $p = 0,004$. A média dos índices de metilação dos sete genes no estadio 3, 4,4 (95% CI: 3,8;5,0) também foi significativamente maior que no estadio 1, 3,4 (95% CI: 2,7;4,2), $p = 0,05$ e também maior que estadio 2, 3,5 (95% CI:2,7;4,2), $p = 0,05$. A média dos índices de metilação foi menor nas amostras normais, 0,85 (95% CI:0,4;1,3).

Para todos os genes, níveis mais altos de metilação estão significativamente associados com uma probabilidade aumentada de ter câncer.

A Figura 6 mostra a curva ROC de dois passos utilizando num passo os genes com 100% de especificidade seguida de análise de regressão logística para todos os genes juntos. A curva mais escura é a internamente validada.

A curva ROC tem como objetivo avaliar o poder discriminativo de um teste hipotético para a detecção de câncer de bexiga utilizando a presença de metilação nos sete genes estudados. Esta curva descreve como o teste se comportaria em relação à sensibilidade e à especificidade. A acurácia (porcentagem de testes cuja discriminação foi realizada corretamente) do teste pode ser medida utilizando a área abaixo da curva ROC: AUC (“area under the curve”). Um valor de AUC de 1 representa um teste perfeito, enquanto uma AUC de 0,5 representa um teste inadequado. Considerando cada gene isoladamente, os valores de AUC variaram de 0,67 para *CRBP* a 0,87 para *AIMI*. Neste caso (Figura 6), utilizamos dois passos da curva ROC, a primeira curva considerando os dois genes com 100% de especificidade (*CCNA1* e *MINT1*) e a segunda utilizando regressão logística com todos os cinco genes restantes. Para a validação interna, utiliza-se um método

disponível no sistema estatístico SAS, no qual, se exclui uma amostra em cada ponto para comparar os valores obtidos.



Legenda: A validação interna está representada pela curva mais escura.

Figura 6 - Curva ROC de dois passos utilizando num passo os genes com 100% de especificidade (*CCNA1* e *MINT1*) seguida de análise de regressão logística para os outros cinco genes estudados (*CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1* e *CRBP*).

Considerando a presença de metilação em qualquer um dos dois genes com 100% de especificidade (*CCNA1* e *MINT1*), 58 (62,37%) pacientes são positivos ($p < 0,0001$). Esta porcentagem representaria a sensibilidade de um teste hipotético utilizando a presença de metilação nestes dois genes para a detecção de câncer de bexiga. A curva mais clara da Figura 6 mostra estes valores de 100% de especificidade e 62,4% de sensibilidade em seu primeiro ponto. A continuação da

curva mostra os valores de sensibilidade encontrados com a adição do segundo passo, ou seja, cada um dos cinco genes restantes (*CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1* e *CRBP*) considerando diferentes níveis de metilação, primeiro os níveis que proporcionariam a maior especificidade, seguidos da menor, o que representa, de maneira geral na curva, uma diminuição de especificidade e um aumento da sensibilidade. A curva mais escura representa a validação interna do teste, utilizando regressão logística com todos os sete genes, para os pacientes que foram negativos no primeiro passo. Para esta validação interna, utiliza-se um método disponível no sistema estatístico SAS, no qual se exclui uma amostra em cada ponto para comparar os valores obtidos. A partir da curva ROC, é possível avaliar um valor de corte considerando a melhor combinação de valores de sensibilidade e especificidade e assim fazer a decisão pelos valores de corte de níveis de metilação encontrados. Como o objetivo do presente estudo é caracterizar as amostras de bexiga estudadas em relação à metilação dos genes escolhidos, a situação de teste para detecção do câncer de bexiga é apenas hipotética. HOQUE et al. (2006) analisaram amostras de urina de pacientes portadores de câncer de bexiga e compararam com amostras de pacientes sem evidência de tumores urogenitais e utilizaram esta abordagem para analisar os melhores valores a serem utilizados para um possível teste de detecção baseado em metilação de promotores gênicos.

A metilação em nenhum dos sete genes estudados se mostrou preditiva de sobrevida neste grupo de pacientes. Houve vinte e quatro mortes dentro dos setenta e sete pacientes com dados de sobrevida disponíveis. A sobrevida global mediana foi de 12 anos e o tempo mediano de seguimento dos pacientes foi de sete anos e meio.

5 DISCUSSÃO

Há cada vez mais evidências de que modificações epigenéticas, principalmente a metilação do DNA, são alterações freqüentes e essenciais no processo de carcinogênese. Além disso, parece haver perfis de metilação característicos para diferentes tipos tumorais. Embora as alterações epigenéticas na tumorigênese da bexiga não sejam totalmente conhecidas e seu papel na gênese e progressão desse tipo de câncer ainda não estejam bem estabelecidos, vários trabalhos recentes discutem o seu potencial como marcador molecular (AL-SUKHUN e HUSSAIN 2003).

Na primeira parte do presente trabalho, foram avaliadas as freqüências de metilação dos genes *14-3-3 σ* , *RAR β* , *APC* e *E-CAD* em tumores de bexiga. A freqüência da detecção da metilação em cada um desses genes se mostrou alta. Aproximadamente 91% das amostras apresentaram metilação em um destes quatro genes, o que demonstra que estas alterações parecem ser freqüentes no câncer vesical.

Alguns estudos foram publicados analisando o status de metilação de um painel de genes em tumores primários de bexiga. Três dos genes escolhidos para o nosso estudo (*RAR β* , *APC* e *E-CAD*) foram analisados nestes trabalhos. MARUYAMA et al. (2001) analisaram o perfil de metilação nas regiões promotoras de um painel de dez genes e neste painel estavam inclusos *RAR β* , *APC* e *E-CAD* e as freqüências de metilação observadas foram respectivamente 11%, 35% e 36%. Estes autores estabeleceram uma correlação estatisticamente significativa entre pacientes

que apresentavam o gene *E-CAD* metilado e uma menor sobrevida. CHAN et al. (2002) analisaram um painel de sete genes, dentre eles *RAR β* e *E-CAD*, em tumores de pacientes portadores de câncer de bexiga e amostras de urinas correspondentes aos tumores. As frequências de metilação encontradas neste trabalho foram de 87,8% para *RAR β* e de 63,3% para *E-CAD*. TADA et al. (2002) analisaram a hipermetilação da região promotora de um painel de sete genes incluindo *E-CAD* e este gene se apresentou como metilado em 48% das amostras estudadas. Para as amostras estudadas neste trabalho as frequências de metilação encontradas foram 58,9% para *APC*, 49,3% para *RAR β* e 28,8% para *E-CAD*. Comparando as seqüências de “primers” utilizados nos quatro estudos (incluindo este), as únicas seqüências comuns a todos os trabalhos são as seqüências de “primers” para *E-CAD*. Portanto, as diferenças de frequências de metilação encontradas entre os estudos para este mesmo gene poderiam ser atribuída a diferenças populacionais. Para os outros dois genes, há a questão da utilização de “primers” com seqüências diferentes além da questão populacional. Ainda comparando os quatro estudos, é possível observar que estes três genes apresentam frequências acima de 28% (com exceção de *RAR β* no trabalho de MARUYAMA et al. de 2001) e isso parece indicar a importância destas alterações na tumorigênese de bexiga.

DULAIMI et al. (2004) estudaram a hipermetilação de cinco genes, dentre eles *APC*, em quarenta e cinco tumores de bexiga e observaram metilação neste gene em 69% das amostras estudadas e estabeleceram que um painel contendo três genes (*P14*, *APC* e *RASSF1A*) se mostrava capaz de caracterizar todos os tumores, ou seja, todos os tumores apresentavam pelo menos um desses três genes metilados. O mesmo painel foi testado em amostras de urina correspondentes aos mesmos tumores

e mostrou uma sensibilidade de 87% e 100% de especificidade. É ainda importante enfatizar que 16% das amostras de urina em que foi possível detectar hipermetilação em um ou mais dos genes do painel tinham se apresentado como negativas na citologia urinária. Estes resultados mostram mais uma vez a alta frequência de metilação na região promotora do gene *APC* e sua importância no câncer de bexiga. Estes autores utilizaram as mesmas seqüências de “primers” que o presente estudo.

O gene *14-3-3 σ* nunca havia sido relatado como metilado em câncer de bexiga até recentemente. Um artigo de KUNZE et al. (2006) (que está em fase de publicação e estará disponível em outubro deste ano) demonstrou a presença de metilação no gene *14-3-3 σ* em 57,1% de tumores de células transitórias de bexiga de alto grau e estadio avançado, sendo possível também observar a redução da expressão em nível de proteína (pela técnica de imunistoquímica) mais frequentemente em tumores de estadio avançado e alto grau do que nos tumores de estadio e graus menores. A frequência de metilação deste gene também se apresentou alta em tumores de bexiga não uroteliais. Estes resultados indicam a participação da hipermetilação de *14-3-3 σ* na progressão tumoral e no seu aumento de potencial malignidade e também na diferenciação celular em tumores de bexiga, resultando na mudança fenotípica de tumores de células transitórias para carcinomas não uroteliais. Estes resultados estão de acordo com os achados de MOREIRA et al. (2004) que mostraram a baixa expressão de *14-3-3 σ* em nível de proteína em carcinomas de células transitórias invasivos, em particular em tumores sofrendo transição de epitelial para mesenquimal, o que sugeriu que a diminuição de expressão da proteína codificada por *14-3-3 σ* parece participar da progressão do câncer de bexiga e de eventos de diferenciação celular neste tipo tumoral. As evidências

mostradas por KUNZE et al. (2006) reforçam a possibilidade de a metilação ser um mecanismo importante de silenciamento gênico que estaria acarretando a diminuição da expressão em nível de proteína e participando da progressão e diferenciação do câncer de bexiga.

14-3-3 σ se apresentou como o gene mais frequentemente metilado nas amostras estudadas na primeira parte, o que sugere que esta alteração pode ser freqüente em câncer de bexiga. A metilação deste gene já foi estudada em outros tipos tumorais como tumores de mama, de vulva, carcinomas orais, carcinomas gástricos e hepatocelulares e principalmente em câncer de mama (FERGUSON et al. 2000; UMBRICH et al. 2001) e de vulva (GASCO et al. 2002). Foram observadas altas freqüências de metilação e evidências de participação desta alteração epigenética na progressão tumoral em todos os tipos estudados.

O gene *14-3-3 σ* foi identificado como sendo responsável (juntamente com outros membros da grande família a que pertence) pela parada do ciclo celular na fase G2 em resposta a danos ao DNA, sendo induzido por *TP53*. Também se observou que ele é um regulador crítico da via de senescência das células epiteliais. É importante ressaltar que a via de *TP53* é considerada extremamente importante para a carcinogênese e alterações em genes que participam desta via parecem exercer um papel importante neste processo. As características citadas sugerem que *14-3-3 σ* pode atuar como um gene supressor de tumor, o que concorda com a sua inativação pelo mecanismo de metilação.

Com intuito de verificar se a metilação de *14-3-3 σ* resulta na perda de expressão em nível de mRNA, foi realizado um tratamento com o agente desmetilante (inibidor de metiltransferases) 5-Aza-2'-deoxicitidina de linhagens

celulares derivadas de neoplasias de bexiga (uma que apresentava metilação neste gene e outra que não apresentava). Foi possível demonstrar que a linhagem que se apresentava metilada teve os seus níveis de metilação reduzidos enquanto teve a sua expressão reativada, enquanto na linhagem que não apresentava metilação do gene em questão não foram observadas alterações. Para quantificar o restabelecimento da expressão do gene, foi utilizado um método quantitativo de expressão em nível de mRNA: a RT-PCR em tempo real. A expressão do gene *14-3-3 σ* nas linhagens celulares foi analisada comparativamente a um “pool” (uma mistura) de amostras de RNA de bexiga normal obtido comercialmente para que pudesse ser estabelecida uma comparação da expressão entre as células normais e tumorais. Em experimentos de quantificação da expressão gênica entre duas populações de amostras diferentes, deve-se sempre levar em consideração a existência de erros na quantificação do RNA, bem como variações na eficiência da reação de transcrição deste RNA para cDNA. Para tanto foi analisada também a expressão de um gene constitutivo (gene que idealmente apresenta níveis constantes de expressão nas células estudadas) com intuito de diluir essas diferenças. A quantificação relativa da análise da expressão gênica usando reação de amplificação por meio de PCR em tempo real foi calculada pela equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrita em detalhes por LIVAK e SCHMITTGEN (2001), o que permitiu que o resultado fosse expresso no número de vezes que o gene estudado teve a sua expressão aumentada ou diminuída em relação à mistura de amostras de tecidos normais. Foram utilizadas amostras referentes aos diferentes momentos do tratamento com o agente desmetilante, além de amostras tratadas com diferentes doses da droga. Comparando os resultados obtidos, foi possível observar o restabelecimento da expressão ocorrendo de maneira dose dependente. Tais

resultados sugerem que a metilação de *14-3-3 σ* está correlacionada com a perda de expressão do gene na linhagem celular derivada de câncer de bexiga testada.

Devido à alta frequência de metilação observada para o gene *14-3-3 σ* , foi feita a opção de analisar a metilação deste gene com o método quantitativo QMSP em 25 amostras de tumores de bexiga e 5 amostras normais. O gene *14-3-3 σ* se mostrou metilado em 100% das amostras tumorais, e esta frequência mais elevada em relação à detectada na primeira parte do estudo é provavelmente devido a uma maior sensibilidade da técnica QMSP quando comparada à MSP. Todavia, a mesma frequência encontrada nos tumores foi observada nas amostras normais, 100% de metilação. A partir destes resultados, este gene não se mostrou como útil para um possível teste para detecção de câncer de bexiga. Esta alta frequência de metilação encontrada nas amostras normais pode ser explicada pelo fato deste gene já ter sido como frequentemente metilado em linfócitos (BHATIA et al. 2003). Apesar da hipermetilação do gene *14-3-3 σ* ter sido considerada como marcador em potencial para o câncer de mama (FERGUSON et al. 2000), a ocorrência de metilação deste gene em linfócitos normais impede o seu uso em testes realizados em fluidos corpóreos, nos quais a presença de linfócitos induzirá a positividade do teste, independentemente da presença de células neoplásicas.

Com o objetivo de identificar marcadores adicionais, nós avaliamos vinte e um genes (*14-3-3 σ* , *CTNNB1*, *CALCA*, *hMLH1*, *PGP9.5*, *DAPK*, *CCND2*, *HIC1*, *AIM1*, *DCC*, *MINT1*, *MINT31*, *FANC-F*, *TGF- β 2*, *ATM*, *CRBP*, *THBS1*, *CCNA1*, *ESR*, *FHIT* e *MTIG*) em um conjunto de avaliação contendo 25 amostras tumorais e cinco normais. Os sete genes mais frequentemente metilados foram selecionados para estudo no conjunto de validação contendo 93 tumores de bexiga e 26 normais.

Os sete genes incluem: *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1*, todos eles possuindo papel na tumorigênese e nunca tinham tido seu padrão de metilação analisado em tumores de bexiga.

O gene da ciclina D2 (*CCND2*) tem função fundamental no ciclo celular e já foi demonstrado como freqüentemente metilado em câncer de mama (PARRELA et al. 2004; LEWIS et al. 2005) e em câncer de próstata (PADAR et al. 2003). As ciclinas do tipo D (ciclinas D1, D2 e D3) estão envolvidas na regulação da transição da fase G1 para S durante o ciclo celular. Por elas terem uma função crucial na regulação do ciclo celular, alterações ou perda na sua expressão podem interromper ou desorganizar o ciclo celular, o que as faz ter um papel de oncogenes ou genes supressores de tumor, dependendo da alteração (PADAR et al. 2003).

A proteína codificada pelo gene *PGP9.5* (*Protein gene product 9.5*, também conhecido como *UCHL1*) é neuro-específica e tem como função remover a ubiquitina de proteínas celulares ubiquitinizadas, evitando assim que elas sejam degradadas pela via dependente de proteassomo ou podendo assim, regular sua localização e função (BITTENCOURT ROSAS et al. 2001). Já foi demonstrado como hipermetilado em câncer gástrico (YAMASHITA et al. 2006), em tumores colorretais (OKOCHI-TAKADA et al. 2006), em tumores uterinos (ROLEN et al. 2006) e em câncer de esôfago, no qual foi associado com pior prognóstico dos pacientes e presença de metástases em linfonodos (MANDELKER et al. 2005). Os dados dos estudos citados sugerem a participação da metilação de *PGP9.5* na carcinogênese e neste estudo foi demonstrada uma alta freqüência de metilação neste gene em câncer de bexiga pela primeira vez, enfatizando a participação desta alteração na tumorigênese.

O gene *CRBP* (*Cellular retinol-binding protein 1*) participa da via do ácido retinóico; a diminuição de expressão de *CRBP-1* em câncer promove a progressão tumoral através da inibição da atividade do receptor do ácido retinóico e estimula a via *PI3K/Akt* através de um novo mecanismo (FARIAS et al. 2005). Já foi observado hipermetilado em câncer de próstata (JERÓNIMO et al., 2004).

O gene da ciclina A1 (*CCNA1*) tem um papel importante no ciclo celular e se liga com CDK2, já foi demonstrado que este gene participa da entrada na metáfase da meiose I de células germinativas de macho e também tem função no reparo de DNA (MULLER-TIDOW et al. 2004). TOKAMURO e al. (2004) mostraram alta frequência de metilação em tumores de cabeça e pescoço. Altas frequências de metilação em *CCNA1* foram observadas em tumores uterinos invasivos (KITKUMTHORN et al. 2006).

O gene da calcitonina (*CALCA*) regula níveis de cálcio via adenilato ciclase. Já foi demonstrado como hipermetilado em câncer de tireóide (HU et al. 2006), em câncer de útero (WIDSCHWENDTER et al. 2004) e em mielodisplasias (VIDAL et al. 2006).

O gene *AIM1* (*Absent in melanoma 1*) é candidato a gene supressor de tumor, parece interagir com citoesqueleto (DU e FISHER, 2002). Foi demonstrado experimentalmente uma associação entre a sua expressão com a reversão do potencial tumorigênico de melanomas malignos humanos (RAY et al. 1997). Os estudos analisando suas frequências de metilação estão em andamento, mas ainda não há resultados publicados.

MINT1 (“Methylated in tumors” 1) é um *locus* que possui uma ilha de CpG, localizado na região 5q13-14 que foi demonstrada como metilada em câncer

colorretal originalmente (TOYOTA et al. 1999a), apesar de sua função ainda ser desconhecida. Há diversos estudos desta ilha de CpG em tumores colorretais; por exemplo foi observado em 15% das amostras de câncer colorretal analisadas por XU et al. em 2004. Neste estudo, o seu status de metilação foi investigado em tumores de bexiga pela primeira vez.

O método utilizado nesta segunda parte do estudo (QMSP) apresenta uma alta sensibilidade para a detecção de metilação aberrante nos promotores dos genes estudados, portanto permite uma maior identificação destas alterações nos tumores de bexiga e, ao mesmo tempo, no tecido vesical normal. Portanto, é possível analisar de maneira muito objetiva a presença ou ausência de metilação nas regiões estudadas.

Considerando os sete genes selecionados para o conjunto de validação (*CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1*), 94,6% das amostras de tumores de bexiga apresentaram metilação na região promotora em pelo menos um deles. Esta é uma frequência bastante alta, mas é preciso considerar que foram analisados sete genes, o que representa um número alto de marcadores em potencial. Em relação às amostras normais, 50% delas não apresentaram metilação na região promotora de nenhum dos genes escolhidos. Se excluirmos o gene *AIM1* (que foi o gene mais frequentemente metilado em amostras normais), 38,5% das amostras normais apresentam metilação em pelo menos um dos seis genes e 86,0% das amostras tumorais. Cada painel montado em combinação destes genes mostrará variações nestes valores, mas mantendo seis genes, os valores se mostram acima de 80% para as amostras tumorais e abaixo de 50% nas amostras normais.

Após o estabelecimento das alterações freqüentes em tumores vesicais e com valores de sensibilidade e especificidade satisfatórios, pode-se prosseguir para um teste em fluídos corpóreos e no caso da bexiga, preferencialmente a urina, por apresentar células descamadas da bexiga (SIDRANSKY 2002) e ser de fácil coleta. Muitos estudos utilizaram MSP convencional para detectar células neoplásicas em plasma, soro, linfonodos e escarro de pacientes portadores de diversos tipos de câncer (CAIRNS et al. 2004; IBANEZDE et al. 2004). A técnica de MSP apresenta limitações principalmente devido à sua subjetividade na interpretação de resultados. Já a técnica de QMSP permite uma avaliação automatizada e muito sensível da presença de alelos metilados, sendo uma análise quantitativa e que permite uma maior segurança na reprodutibilidade dos dados. Se for considerada a utilização de vários genes, formando um painel a ser analisado, a chance de sucesso aumenta, pois um painel tem vantagens sobre um marcador único, por ter a possibilidade de cobrir a heterogeneidade presente entre os tumores, assim como nas diferentes porções do mesmo tumor.

A recente importância atribuída a alterações epigenéticas em tumores enfatiza o conceito de complementaridade entre alterações genéticas e epigenéticas. Devido aos muitos estudos realizados caracterizando câncer de bexiga através da presença de alterações genéticas, é preciso considerar a possibilidade de que alguns tumores de bexiga podem não apresentar alterações epigenéticas e estes precisariam ser detectados com outras abordagens, as quais contemplassem alterações genéticas freqüentes nestes tipos tumorais como mutação em *TP53*, perda de heterozigotidade e deleções (CAIRNS et al. 1995; MAO et al. 1996; STEINER et al. 1997). Portanto, um perfil de alterações presentes em um tumor deve conter tanto alterações genéticas

como epigenéticas e, juntas, estas alterações se mostram cada vez mais importantes para clínica, de maneira geral.

A cistoscopia é atualmente o “gold standard” para a detecção do câncer de bexiga e oferece o potencial tanto de identificar a presença do tumor quanto remover lesões pequenas. Portanto um teste de detecção na urina de um painel de genes poderia complementar e evitar o uso da cistoscopia em alguns casos, mas não substituir por completo. No entanto, existindo a possibilidade de substituir em alguns casos, como apenas para acompanhamento, já seria vantajoso, uma vez que este exame apresenta complicações (como infecção urinária), desconforto para o paciente e altos custos (por ser um procedimento hospitalar).

Mesmo após cistectomia radical, as taxas de recidiva permanecem altas. O fator prognóstico de maior impacto mais significativo é o estadiamento tumoral (BASSI et al. 1999). A recorrência é consequência da presença de micrometástases a distância ocultas, mas já presentes no momento da cirurgia. Por isso, há interesse em marcadores capazes de detectar a presença de células neoplásicas, mesmo quando presentes em quantidades muito baixas.

Muitos estudos têm como objetivo estabelecer testes de detecção de câncer de bexiga através de um exame realizado com urina. Um estudo de STEINER et al. (1997) mostrou a possibilidade de análise de microssatélites baseada em PCR em amostras de urina de pacientes que já haviam sido tratados para câncer de bexiga e essa análise foi capaz de detectar a recidiva da doença em 90,9% dos casos de quatro a seis meses antes da detecção por cistoscopia. Outro estudo apresentou um teste de detecção em urina de perda de heterozigose no gene *TP53*, em que todos os achados na urina foram correspondentes aos dos tumores dos mesmos pacientes

(FRIEDRICH et al. 2000). SERIPA et al. (2001) demonstraram que a detecção de perda de heterozigose e instabilidade de microssatélites baseada em PCR se mostrou mais sensível que a citologia convencional para a detecção de câncer de bexiga. Outro estudo que também analisou perda de heterozigose e instabilidade de microssatélites para detectar câncer de bexiga foi capaz de detectar a doença em 75% dos casos de um a nove meses antes da detecção pela cistoscopia (AMIRA et al. 2002).

Alguns artigos foram publicados recentemente utilizando a técnica de QMSP com amostras de câncer de bexiga. FRIEDRICH et al. (2004) analisaram o status de metilação de regiões promotoras de 12 genes associados com apoptose (*P14*, *FADD*, *TNFSF21*, *BAX*, *LITAF*, *DAPK*, *TMS-1*, *BCL2*, *RASSF1A*, *TERT*, *TNFSF25* e *EDNRB*) em dezoito linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga, 127 tumores de bexiga, 37 amostras normais de bexiga e 37 amostras de urina de pacientes com câncer vesical. O grupo observou associação estatisticamente significativa da metilação na região promotora de *BCL2* com grau e estágio tumoral e das regiões promotoras de *P14* e *RASSF1A* apenas com estágio tumoral. A metilação dos promotores de *TERT* e *EDNRB* foi identificada como preditoras do grau tumoral. O mesmo grupo, em 2006 (FRIEDRICH et al. 2006), avaliou o valor prognóstico da hipermetilação em 20 genes associados com câncer (*P14*, *P16*, *STAT-1*, *SOCS-1*, *DR-3*, *DR-6*, *PIG-7*, *BCL-2*, *H-TERT*, *BAX*, *EDNRB*, *DAPK*, *RASSF1A*, *FADD*, *TMS-1*, *E-CAD*, *ICAM-1*, *TIMP-3*, *MLH-1*, *COX-2*) em 105 tumores de câncer de bexiga não invasivos. Neste trabalho, eles identificaram seis genes (*SOCS-1*, *STAT-1*, *BCL-2*, *DAPK*, *TIMP-3*, *E-CAD*), nos quais a presença de metilação estava associada com recidiva tumoral. Também, a metilação de *TIMP-3* foi capaz de prever uma

maior sobrevida livre de doença. YATES et al. (2006) analisaram a hipermetilação da região promotora de 8 genes (*DAPK*, *RASSF1A*, *E-CAD*, *RAR β* , *P14*, *P16*, *GSTP1* e *APC*) em 35 amostras de urinas de pacientes com câncer de bexiga, 35 de controles normais com idade acima de 70 anos e 34 de controles normais com idades abaixo de 40 anos. Eles observaram maiores frequências de metilação no grupo de pacientes que nos grupos controles e um menor índice de metilação no grupo de controles abaixo de quarenta anos e puderam concluir, portanto que a frequência e a extensão de metilação aumenta com a idade e com a presença da malignidade. HOQUE et al. (2006) analisaram o status de nove (*RASSF1A*, *APC*, *E-CAD*, *RAR β* , *P14*, *P16*, *GSTP1*, *MGMT* e *TIMP-3*) promotores gênicos em amostras de tumores vesicais pareadas com amostras de urinas de 15 pacientes pela técnica de QMSP. Adicionalmente testaram 160 amostras de urinas de pacientes portadores de câncer de bexiga em diversos estadios e 94 amostras de controles sem evidência de câncer genito-urinário. Nos casos pareados, o perfil de metilação observado nas urinas foi correspondente ao observado nos tumores. Considerando apenas quatro genes (*P14*, *P16*, *GSTP1* e *MGMT*), 69% das amostras mostraram metilação em pelo menos um destes genes, para os quais todos os controles foram negativos, correspondendo a 100% de especificidade. Os dados obtidos nos trabalhos citados acima apóiam a potencialidade do uso de hipermetilação de promotores gênicos no diagnóstico e para a prever o prognóstico de pacientes portadores de câncer de bexiga, com a vantagem dos testes serem factíveis em urina.

Este último artigo citado (HOQUE et al. 2006) foi publicado pelo grupo do Dr. David Sidransky, mesmo grupo no qual realizamos a segunda parte deste trabalho. Com os resultados obtidos no presente trabalho, os sete genes (*CALCA*,

PGP9.5, CCND2, AIM1, MINT1, CRBP e CCNA1) serão futuramente testados em amostras de urina de pacientes portadores de câncer de bexiga e de pacientes sem sinal de doenças genito-urinárias. Com isso, o painel apresentado no trabalho acima poderá ser alterado, genes adicionados ou mesmo substituídos de acordo com os valores de sensibilidade e especificidade encontrados no estudo futuro. O principal objetivo é estabelecer um painel com o menor número de genes possível e com as maiores especificidades e sensibilidades encontradas para a detecção de câncer de bexiga em urina através da técnica de QMSP. Para a redução de custo desta técnica, o desenvolvimento de reações “multiplex” (que analisem diversos genes numa mesma PCR) é necessário. A implementação de testes de detecção baseados em PCR em tempo real, como a QMSP, na rotina de análises clínicas depende de redução de custo e de tempo de realização.

Em resumo, este trabalho utilizou duas técnicas de PCR diferentes para detecção de metilação, uma qualitativa, conhecida como MSP convencional e uma qualitativa, chamada de QMSP. A QMSP é sabidamente mais sensível que a MSP e foi possível comprovar este fato observando os resultados achados para o gene *14-3-3 σ* . Os sete genes (*CALCA, PGP9.5, CCND2, AIM1, MINT1, CRBP e CCNA1*) analisados por QMSP em 93 amostras tumorais e 26 normais de bexiga mostraram altas frequências de metilação das suas regiões promotoras nos tumores estudados e mais baixas nos normais incluídos na análise. Todavia, os valores encontrados nas amostras normais comprometem a especificidade destes potenciais marcadores. Ainda assim, como estas alterações se mostraram freqüentes, estes sete genes se mostraram como potenciais marcadores para o câncer de bexiga. Em conclusão, o processo de silenciamento de genes devido à hipermetilação de seus promotores

parece ser um evento freqüente e importante no câncer de bexiga. Segundo o nosso estudo, a metilação da região promotora dos genes *CALCA*, *PGP9.5*, *CCND2*, *AIM1*, *MINT1*, *CRBP* e *CCNA1* parece ser importante na carcinogênese do tumor de bexiga.

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

6 CONCLUSÕES

- A hipermetilação de promotores gênicos tem sido explorada tanto como mecanismo de inativação gênica na carcinogênese quanto como marcador molecular em potencial para diagnóstico e prognóstico de determinados tipos tumorais. A caracterização destas alterações epigenéticas em tumores, principalmente o estudo de genes não amplamente estudados em determinados tipos tumorais contribui para um melhor conhecimento das alterações acumuladas no processo de carcinogênese permitindo ainda a identificação de marcadores eficazes para o uso na clínica.
- Na primeira parte do estudo, a alta frequência de expressão, somada ao fato de que a metilação no promotor de *14-3-3 σ* está correlacionada com a perda de expressão, uma vez que a expressão deste gene foi restabelecida após o tratamento de uma linhagem celular derivada de câncer de bexiga que apresentava metilação neste gene com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxycitidina, indicaram o seu potencial como marcador. Entretanto, através da técnica quantitativa QMSP, *14-3-3 σ* , mostrou-se metilado em 100% das amostras de câncer de bexiga, no entanto, também foi observado metilado em 100% das amostras normais e portanto a sua utilidade como um marcador para um possível teste para detecção de câncer de bexiga não se confirmou.

- Usando a técnica QMSP, as amostras tumorais testadas mostraram níveis de metilação mais altos do que os observados nas amostras normais. Os melhores candidatos foram *MINT1* e *CCNA1*, por terem altas frequências em amostras de câncer de bexiga e ausência de metilação em amostras normais. Igualmente, a metilação em *CRBP* foi observada em somente uma amostra normal e a metilação neste gene apresentou uma frequência nas amostras tumorais de mais de 38%. Os outros quatro genes (*AIM1*, *CALCA*, *PGP9.5* e *CCND2*) mostraram frequência acima de 15% em amostras normais, o que limita seus potenciais como candidatos a marcadores moleculares.
- 94,6% das amostras tumorais estudadas na segunda fase mostraram um ou mais genes metilados, enquanto nas amostras normais, 50% não apresentaram metilação em nenhum dos sete genes. Considerando os dois genes com 100% de especificidade (*MINT1* e *CCNA1*), a sensibilidade da sua combinação é de 62,7%, o que representa valores aceitáveis para testes clínicos de rotina. Estes achados reforçam o potencial destes marcadores para serem testados em fluídos corpóreos (urina) para o possível estabelecimento de um teste de detecção de câncer de bexiga.
- Apesar das altas frequências de hipermetilação encontradas para os genes estudados em amostras tumorais e as baixas frequências observadas nas amostras normais sugerirem o potencial destas alterações epigenéticas como marcadores moleculares de câncer de bexiga, estudos com maiores

números de amostras, com mais dados clínico-patológicos e com tempos de seguimento mais longos, além de o teste destes candidatos em fluídos corpóreos, principalmente urina, são necessários para que estes achados moleculares possam ser utilizados na clínica como marcadores para o diagnóstico e o acompanhamento de pacientes portadores de câncer de bexiga.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Sukhun S, Hussain M. Molecular biology of transitional cell carcinoma. **Crit Rev Oncol Hematol** 2003; 47:181-93.

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

Bassi P, Ferrante GD, Piazza N, et al. Prognostic factors of outcome after radical cystectomy for bladder cancer: a retrospective study of a homogeneous patient cohort. **J Urol** 1999; 161:1494-7.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer** 2006; 6:107-16.

Bhatia K, Siraj AK, Hussain A, Bu R, Gutierrez MI. The tumor suppressor gene 14-3-3 sigma is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2003; 12:165-9.

Bittencourt Rosas SL, Caballero OL, et al. Methylation status in the promoter region of the human PGP9.5 gene in cancer and normal tissues. **Cancer Lett** 2001; 170:73-9.

Borden LS Jr, Clark PE, Hall C. Bladder cancer. **Cur Opin Onc** 2003; 15:227-33.

Borden LS Jr, Clark PE, Hall C. Bladder cancer. **Curr Opin Oncol** 2005; 17:275-80.

Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumors. **Nat Genet** 1995; 11:210-2.

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

Cairns P. Detection of promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from kidney cancer patients. **Ann NY Acad Sci** 2004; 1022:40-3.

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

Cox DR. **The analysis of binary data**. London: Methuen; 1970.

Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, et al. Focus on bladder cancer. **Cancer Cell**. 2004;6:111-6.

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

Du J, Fisher DE. Identification of Aim-1 as the underwhite mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. **J Biol Chem** 2002; 277:402-6.

Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. **Clin Cancer Res** 2004; 10:1887-93.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. Methylight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Res** 2000; 28:1-8.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology Consensus Classification

of Urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder Bladder Consensus Conference Committee. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:1435-48.

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

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

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

Farias EF, Marzan C, Mira-y-Lopez R. Cellular retinol-binding protein-I inhibits PI3K/Akt signaling through a retinoic acid receptor-dependent mechanism that regulates p85-p110 heterodimerization. **Oncogene** 2005; 24:1598-606.

Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. **Semin Cancer Biol** 2004; 14:427-32.

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

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

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

Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, et al. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. **Clin Cancer Res** 2004; 10:7457-65.

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

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

Gutierrez MI, Siraj AK, Khaled H, Koon N, El-Rifai W, Bhatia K. CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer. **Mod Pathol** 2004; 17:1268-74.

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

Harden SV, Guo Z, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative *GSTP1* methylation clearly distinguishes benign prostate tissue and limited prostate adenocarcinoma. **J Urol** 2003; 169:1138-42.

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

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

Hoque MO, Lee J, Begum S, Yet al. High-throughput molecular analysis of urine sediment for the detection of bladder cancer by high-density single-nucleotide polymorphism array. **Cancer Res** 2003; 63:5723-6.

Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, et al. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:996-1004.

Hu YC, Sidransky D, Ahrendt SA. Molecular detection approaches for smoking associated tumors. **Oncogene** 2002; 21:7289-97.

Hu S, Ewertz M, Tufano RP, et al. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:98-104.

Hussain SA, James ND. Molecular markers in bladder cancer. **Semin Radiat Oncol** 2005; 15:3-9.

Ibanezde Caceres I, Battagli C, Esteller M, et al. Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients. **Cancer Res** 2004; 64:6476-81.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:106-30.

Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1747-52.

Jerónimo C, Henrique R, Oliveira J, et al. Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer. **J Clin Pathol** 2004; 57:872-6.

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

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

Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, et al. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:55.

Kunze E, Wendt M, Schlott T. Promoter hypermethylation of the 14-3-3 sigma, SYK and CAGE-1 genes is related to the various phenotypes of urinary bladder carcinomas and associated with progression of transitional cell carcinomas. **Int J Mol Med** 2006; 18:547-57.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Lewis CM, Cler LR, Bu DW, et al. Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. **Clin Cancer Res** 2005; 11:166-72.

Mandelker DL, Yamashita K, Tokumaru Y, et al. PGP9.5 promoter methylation is an independent prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 2005; 65:4963-8.

Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. **Science** 1996; 271:659-62.

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa/2006 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

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

Moreira JM, Gromov P, Celis JE. Expression of the tumor suppressor protein 14-3-3 sigma is down-regulated in invasive transitional cell carcinomas of the urinary bladder undergoing epithelial-to-mesenchymal transition. **Mol Cell Proteomics** 2004; 3:410-9.

Muller-Tidow C, Ji P, Diederichs S, et al. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol** 2004; 24:8917-28.

Okochi-Takada E, Nakazawa K, Wakabayashi M, et al. Silencing of the UCHL1 gene in human colorectal and ovarian cancers. **Int J Cancer** 2006; 119:1338-44.

Oliveira MBR. **Avaliação da detecção de hipermetilação de promotores gênicos como marcador molecular para o câncer de bexiga**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Padar A, Sathyanarayana UG, Suzuki M, et al. Inactivation of cyclin D2 gene in prostate cancers by aberrant promoter methylation. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4730-4.

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

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. **Int J Cancer** 1999; 80:827-41.

Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, et al. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5349-54.

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

Quek ML, Sanderson K, Daneshmand S, Stein JP. New molecular markers for bladder cancer detection. **Curr Opin Urol** 2004; 14:259-64.

R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2004.

Ramakumar S, Bhuiyan J, Besse JA, et al. Comparison of screening methods in the detection of bladder cancer. **J Urol** 1999; 161:388-94.

Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM. AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 94:3229-34.

Rolen U, Kobzeva V, Gasparjan N, et al. Activity profiling of deubiquitinating enzymes in cervical carcinoma biopsies and cell lines. **Mol Carcinog** 2006; 45:260-9.

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

Rosenbaum E, Hoque MO, Cohen Y, et al. Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy. **Clin Cancer Res** 2005; 11:8321-5.

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

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

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

SAS Institute Inc. **SAS/STAT Users Guide** (Volume 2): Statistics, Version 8th ed.; Cary: SAS Institute Inc; 1999.

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

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

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

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

Smiraglia DJ, Rush LJ, Frühwald MC, et al. Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. **Human Mol Genet** 2001; 10:1413-9.

Sobin LH, Wittekind Ch. TNM: classificação de tumores malignos. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

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

Syrigos KN, Karapanagiotou E, Harrington KJ. The clinical significance of molecular markers to bladder cancer. **Hybrid Hybridomics** 2004; 23:335-42.

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

Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, et al. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. **Cancer Res** 2004; 64:5982-7.

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

Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. **Cancer Res** 1999a; 59:2307-12.

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

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

Verma M, Kagan J, Sidransky D, Srivastava S. Proteomic analysis of cancer-cell mitochondria. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:789-95.

Vidal DO, Paixao VA, Brait M, et al. Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. **Leuk Res** 2006 (manuscrito em fase de publicação).

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

Wagner PD, Verma M, Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. **Ann N Y Acad Sci** 2004; 1022:9-16.

Widschwendter A, Muller HM, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. **Clin Cancer Res** 2004; 10:565-71.

Williams SG, Stein JP. Molecular pathways in bladder cancer. **Urol Res** 2004; 32:373-85.

Xu XL, Yu J, Zhang HY, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. **World J Gastroenterol** 2004; 10:3441-54.

Yang SC, Lee DH, Hong SJ, Chung BH, Kim IY. Telomerase activity: a potential marker of bladder transitional cell carcinoma in bladder washes. **Yonsei Med J** 1997; 38:155-9.

Yamashita K, Park HL, Kim MS, et al. PGP9.5 methylation in diffuse-type gastric cancer. **Cancer Res** 2006; 66:3921-7.

Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW. Methylation analysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. **Oncogene** 2006; 25:1984-8.

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