

Priscilla Davidson Negraes

Padrão de Metilação Gênica e sua Relação
com o Prognóstico para o Carcinoma de
Células Transicionais de Bexiga



Botucatu - SP
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Negraes, Priscilla Davidson.

Padrão de Metilação Gênica e sua Relação com o Prognóstico para o
Carcinoma de Células Transicionais de Bexiga / Priscilla Davidson Negraes. –
Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Bióciências de Botucatu 2007.

Orientadora: Daisy Maria Favero Salvadori
Co-Orientadora: Cláudia Aparecida Rainho
Assunto CAPES: 40101045

1. Bexiga - Câncer - Aspectos genéticos 2. Genética

CDD 616.99204262

Palavras-chave: Carcinoma de bexiga; Metilação do DNA; Prognóstico



Dedicatória

Ao Papai (*in memoriam*), **João Carlos Passos Negraes**, este homem que eu tanto admiro, meu maior exemplo de altruísmo, honestidade e sabedoria. Alguém que com seu jeito introspectivo mas sempre acolhedor e brincalhão soube, de maneira admirável, transmitir e orientar qual o melhor caminho a seguir, respeitando as diferenças e vontades individuais...

À Mamãe, **Dora Luiza Davidson Negraes**, esta mulher ímpar dotada de uma garra e determinação jamais vistas. Impetuosa e impulsiva, alegre e motivadora, com muito amor nos aninha em seus braços, ouve, mima e aconselha nas mais variadas situações, sempre apoiando e principalmente acreditando em nossas escolhas e agigantando nossa bravura...



Agradecimientos

É muito bom poder agradecer a tantas pessoas que, durante este período em que se é acometido de inúmeros surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço e alegrias, conseguiram se manter simplesmente presentes...

A Deus, em sua onipresença, por me permitir explorar o mundo, me acolhendo, encorajando, enchendo de esperanças e guiando meus passos até aqui

Aos meus Pais, **João Carlos** e **Dora Luiza**, referência para mim ao longo de toda a minha existência, incentivadores e orgulhosos, pelo imenso e incondicional amor, constante estímulo, enorme dedicação, paciência, compreensão e pelas orações. Meu reconhecimento e eterna gratidão... sem vocês eu nada seria

À minha irmã, **Roberta**, uma sonhadora admirável, batalhadora e persistente, que não faz idéia do quanto é imprescindível em minha vida, pela amizade, companheirismo e amor constantes

À Dra. **Daisy Salvadori**, orientadora e amiga, um exemplo de profissionalismo, ética, entusiasmo e sensatez. Agradeço pela oportunidade, confiança, credibilidade, maturidade científica, compreensão e confortável força que me foram proporcionadas durante toda esta jornada, em especial nos momentos mais desgastantes

À Dra. **Cláudia Rainho**, cuja valiosa co-orientação teve importância fundamental e decisiva permitindo não apenas o desenvolvimento como a conclusão de cada etapa deste trabalho. Agradeço pela amizade, dedicação, estímulo e inúmeros ensinamentos

Ao Dr. **João Lauro Viana de Camargo**, pela reavaliação histopatológica das amostras, pelos esclarecimentos clínicos do carcinoma de bexiga e pelo interesse manifestado por este estudo

À Dra. **Maria Luiza Cotrim de Oliveira** e ao estagiário **Bruno Darros**, não somente pela amizade mas também pela colaboração no procedimento de microdissecção a *laser*, sempre bastante atenciosos, cautelosos e curiosos pelos resultados do trabalho

À Dra. **Sílvia Rogatto**, por ceder a infra-estrutura de seu laboratório em alguns momentos do desenvolvimento da presente pesquisa

Aos Drs. **Renato Costa** e **Francisco Quevedo**, médicos urologista e patologista, respectivamente, pertencentes ao Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP, por aceitarem colaborar com esse estudo nos cedendo não somente as amostras a fresco analisadas como também todas as informações pertinentes aos indivíduos incluídos neste projeto

E também ao Dr. **José Goldberg**, médico urologista da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, pelas amostras de lavados vesicais cedidas

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, em especial ao Departamento de Genética e à Seção de Pós-Graduação, bem como à Faculdade de Medicina de Botucatu - Departamento de Patologia, cujas "equipes" devem ter ficado enlouquecidas ao ver a "Priscilla" de lá pra cá o tempo todo... valeu pela compreensão e carinho despendidos, e por permitirem o desenvolvimento deste estudo. Agradeço, ainda, pela amizade conquistada junto aos docentes, alunos e funcionários, sempre muito atenciosos e participativos

Este agradecimento é estendido ao Hospital Amaral Carvalho, Jaú, especialmente aos Departamentos de Urologia e Patologia que aceitaram participar deste trabalho e também ao Grupo de Apoio à Pesquisa (GAP), da Faculdade de Medicina de Botucatu, particularmente ao estatístico **Hélio Nunes**, que foi bastante atencioso em nos auxiliar na análise dos resultados obtidos

À Pós-Graduanda em Patologia, Merielen, por auxiliar na reavaliação histopatológica das amostras incluídas em parafina que foram investigadas

Às estagiárias **Bruna** e **Francine**, pela colaboração no levantamento, organização e avaliação dos dados de arquivo que, juntamente com as alunas **Daniela**, **Érika** e **Layla**, sempre foram compreensivas e criavam um ambiente de trabalho favorável quando eu “monopolizava” o laboratório como um todo... e especialmente por estarem prontas a ajudar em qualquer momento, compartilhando minhas “lamúrias” e acessos de riso intenso... vocês foram e são indispensáveis meninas

Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade e troca de experiências, uma vez que em sua maioria passaram e passam pelo que eu passei, passo e continuarei passando... ficar espacialmente longe da família em busca de um ideal

À Comissão Examinadora, pesquisadores admirados por sua seriedade e comprometimento científicos, agradeço a disponibilidade e também as críticas, sugestões e comentários que sem dúvida em muito contribuirão para que eu continue me empenhando na carreira acadêmica... estímulo para fazer sempre 'mais e melhor'

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro

Aos pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo mesmo sabendo que seus resultados não lhes traria benefícios diretos

Existem pessoas às quais gostaria de dedicar especial atenção pela importância que representam e agradecer de maneira singular, entretanto, não me perdoaria se a memória falhasse e me permitisse omitir algum nome, portanto, vou-lhes expressar meu carinho de forma generalizada, mas cada um sabe de sua importância individual em minha vida... **Amigos...**

Aos que estão longe, por acreditarem em meu trabalho e compreenderem minha "aparente" ausência... são exemplos de pessoas com uma forma toda especial de ser e incentivar, mesmo sem estarem presentes... ao longo dos anos vimos que a distância não é suficiente para nos separar

Aos que estão próximos, pela paciência em acompanhar todos os ritmos deste trabalho, por "aturarem" as inconstâncias de humor, me fazerem rir, emprestarem o ombro para chorar, motivar e principalmente por apenas estarem ao meu lado, sempre

Aos mais recentes, agradeço por me incluírem em seus círculos de amizades e por compartilharem comigo tão bons momentos... estamos somente iniciando o livro de nossos "causos"

Aos de longa data, pelo companheirismo, estando constantemente ao meu lado ainda que apenas em pensamento, pela dedicação e sinceridade nas palavras e atitudes

Aos meus “amigos-irmãos”, “pessoas-anjo” convictas, delicadas, sensíveis e também rudes e práticas quando necessário, simplesmente por lições que não podem ser encontradas em livros... vocês são fundamentais

À Biologia e à Ciência, eternas paixões que crescem comigo e me impulsionam em busca de novas descobertas

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desta etapa, bem como para meu crescimento e amadurecimento profissional e pessoal

Muito Obrigada!

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que a minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo..."

(Fernando Pessoa)



Índice

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Etiopatogenia e Classificação das Neoplasias de Bexiga	23
1.2	Alterações Genéticas e Epigenéticas em Carcinomas Uroteliais	28
1.3	Alterações na Metilação dos Genes <i>CDH1</i> , <i>RARB</i> , <i>SFN</i> e <i>RASSF1</i>	35
1.4	Abordagens Metodológicas para a Identificação de Perfis Diferenciais de Metilação e Determinação de Padrões de Metilação do DNA em Fragmentos Específicos.....	41
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	49
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1	Coleta de Amostras.....	54
3.1.1	Material a fresco	54
3.1.2	Obtenção de células uroteliais a partir de lavados vesicais.....	54
3.1.3	Amostras incluídas em parafina.....	55
3.2	Microdissecção a laser.....	55
3.3	Cultivo Celular.....	56
3.4	Extração de DNA	57
3.4.1	Material a fresco	57
3.4.2	Lavados vesicais, tecido incluído em parafina e linhagens celulares.....	58
3.4.3	Células microdissecadas.....	59
3.5	Modificação do DNA pelo Bissulfito de Sódio	60
3.5.1	Purificação do DNA modificado pelo bissulfito de sódio	61
3.6	Análise do Padrão de Metilação dos genes <i>CDH1</i> , <i>RARB</i> , <i>SFN</i> e <i>RASSF1</i>	62
3.7	MS-AP-PCR (<i>Methylation-Specific Arbitrarily Primed PCR</i>).....	65
3.8	Análise e Interpretação dos Resultados da MS-AP-PCR.....	67
3.9	Sensibilidade e Especificidade.....	71
4	RESULTADOS	72
4.1	Análise Histopatológica dos Fragmentos Tumorais	73
4.2	Avaliação Preliminar <i>in silico</i>	74
4.3	MSP: Genes <i>CDH1</i> , <i>RARB</i> , <i>SFN</i> e <i>RASSF1</i>	85

4.4 MS-AP-PCR (<i>Methylation-Specific-Arbitrarily Primed PCR</i>)	102
5 DISCUSSÃO	105
6 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
ANEXOS.....	145
Anexo I	146
Anexo II	148
Anexo III	150
Anexo IV.....	152
Anexo V.....	155
Anexo VI.....	157
Anexo VII.....	158
Anexo VIII.....	160
Anexo IX.....	165
Anexo X.....	170
Anexo XI.....	174



Resumo

Estratégias para a avaliação de risco, detecção precoce e prevenção do câncer podem ser delineadas a partir de estudos epigenéticos. Este estudo teve como objetivos investigar diferenças nos padrões de metilação que pudessem estar associadas ao desenvolvimento e/ou recorrência do câncer de bexiga. Para tanto, avaliou-se o padrão de metilação na região promotora dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* e, ainda, buscou-se identificar novo gene candidato envolvido no desenvolvimento do carcinoma urotelial de bexiga. Inicialmente, a metodologia de MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) foi conduzida em 57 amostras de tecido de bexiga coletadas a fresco distribuídas em 49 carcinomas de células transicionais (TCC), três carcinomas espinocelulares, dois adenocarcinomas, uma endometriose, uma cistite crônica e uma amostra com ausência de neoplasia. Em 14 TCCs foi possível a análise pareada com o tecido normal adjacente ao tumor. A análise de MSP mostrou que 100% dos tecidos, independente do tipo histológico, apresentaram-se hipermetilados para os genes *CDH1* e *SFN*. A hipermetilação dos genes *RARB* e *RASSF1* foi detectada em 83,3% e 22,9% dos casos de TCCs, respectivamente. Entre os 14 casos pareados de tecidos tumoral e normal, o padrão de metilação foi concordante em 12/14 pares para o gene *RARB* e em 10/14 pares para o gene *RASSF1*. Adicionalmente, foram investigadas as linhagens de TCC de bexiga 5637 e T24, derivadas de tumores de alto grau e alto grau invasivo. Ambas as linhagens exibiram a hipermetilação dos genes *CDH1* e *RASSF1*. Para o gene *RARB*, o padrão hipermetilado não foi encontrado em nenhuma linhagem e a hipermetilação do gene *SFN* foi observada apenas na linhagem 5637. Também foram investigadas 52 amostras de DNA obtidas de células de lavados vesicais de 27 pacientes com história prévia de TCC e 25 pacientes submetidos ao procedimento citoscópico para a pesquisa de neoplasia. A presença de células neoplásicas foi confirmada em 8

amostras de pacientes com TCC prévio. A análise de MSP para os genes *RARB* e *RASSF1* em amostras pareadas de lavados vesicais e o tumor primário e/ou recorrência foi possível em 20/27 casos de pacientes com TCC. Após a reavaliação histopatológica das amostras coletadas a fresco, apenas 24 casos revelaram a existência de epitélio normal adjacente. Estes casos foram selecionados para o procedimento de microdissecção *a laser*, cujo material foi parcialmente empregado no desenvolvimento da MS-AP-PCR (*Methylation-Specific Arbitrarily Primed PCR*) e detecção de perfis diferenciais de metilação. No conjunto, os resultados obtidos sugerem que as alterações epigenéticas podem ser consideradas marcadores de risco pois precedem e acompanham o processo de carcinogênese. Alterações epigenéticas adquiridas podem ser úteis na identificação de novos biomarcadores para a detecção de células tumorais, especialmente em amostras de lavado vesical. Embora a metodologia de *screening* tenha sido otimizada com sucesso, as etapas subseqüentes não foram alcançadas fazendo com que buscássemos nova abordagem na investigação de um biomarcador inédito para a neoplasia de bexiga.

Palavras-chave: carcinoma de bexiga, metilação do DNA, prognóstico



Abstract

Strategies for risk assessment, early detection and prevention of cancer may be drawn by epigenetic studies. The purpose of this study was to investigate differences in the methylation pattern that should be associated with development and/or recurrence of bladder cancer. It was evaluated the methylation pattern of the promoter region of the genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* and *RASSF1*. Furthermore, it was tried to identify a new biomarker related with bladder urothelial carcinoma. The MSP (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction) assay was applied in 57 fresh bladder tissues including 49 transitional cell carcinoma (TCC), three squamous carcinomas, two adenocarcinomas, one endometriosis, one chronic cystitis, and one sample without neoplasia. In 14 TCCs samples it was possible to evaluate the normal tissue surrounding the lesion. The MSP analysis showed 100% of methylation for *CDH1* and *SFN* genes, independently of tumor histology. *RARB* and *RASSF1* genes were hypermethylated in 83.3% and 22.9% of TCCs, respectively. In the 14 paired cases, normal and tumoral tissue, the methylation pattern was concordant in 12/14 pairs for *RARB* and in 10/14 pairs for *RASSF1*. Additionally, 5637 and T24 TCC cell lines, derived from high grade tumor and high grade invasive tumor were analyzed. Both showed hypermethylation for *CDH1* and *RASSF1* genes. None was hypermethylated for *RARB* and only the 5637 cell type showed methylation for *SFN* gene. Fifty two samples of DNA from bladder washes cells were evaluated: 27 from patients with TCC history and 25 from patients undergoing cystoscopy for neoplasia search. The presence of neoplastic cells was confirmed in eight patients with previous TCC. The MSP assay for *RARB* and *RASSF1* genes in paired samples from bladder washes and its primary tumor and/or recurrence was done in 20/27 of patients with TCC history. After histopathology re-evaluation of fresh samples, just 24 revealed the presence of normal epithelium adjacent the tumor. These cases were selected for

laser microdissection procedure, whose material was partially used in MS-AP-PCR (Methylation-Specific Arbitrarily Primed PCR) assay for the identification of differential methylation profiles. Together, the results suggest that epigenetic alteration may be used as risk markers, since they precede and go along with the carcinogenic process. The acquisition of epigenetic abnormalities may be useful in the identification of new biomarkers for tumor cells detection, especially in bladder washes samples. Even though the screening assay was optimized, the subsequent phases could not. Thus, we looked for another approach to find an unprecedented biomarker for bladder neoplasia.

Key-words: bladder carcinoma, DNA methylation, prognostic



1 Introdução

1.1 Etiopatogenia e Classificação das Neoplasias de Bexiga

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas caracterizadas por alterações genéticas que direcionam a transformação do tecido normal em tumoral (Nowell, 1976; Yokota, 2000). Tais alterações envolvem duas classes principais de genes: aqueles que são responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular, os protooncogenes, e os genes supressores tumorais, cuja função é limitar o crescimento celular. A perda ou inativação desses genes promove a perda do controle da proliferação celular e, conseqüentemente, aumenta o risco de desenvolvimento neoplásico (Weinberg, 1991; Harris e Hollstein, 1993).

As células epiteliais, barreira primária de proteção do organismo contra o ambiente externo, estão constantemente expostas a agentes genotóxicos, o que aumenta o risco de sofrerem mutações. No caso das neoplasias vesicais, cerca de 95% dos tumores têm origem nesse tipo celular, predominando os carcinomas de células transicionais (TCC ou carcinoma urotelial), que correspondem a aproximadamente 90% das neoplasias malignas de bexiga, e que vão desde pequenas papilas neoplásicas até lesões extensivamente invasivas (Knowles, 2007). Os TCCs são mais freqüentes em indivíduos do sexo masculino dos centros urbanos, provavelmente devido às diferenças no nível de exposição ocupacional a agentes potencialmente cancerígenos e ao tabagismo (Van der Poel et al., 1999). Os carcinomas espinocelulares, responsáveis por 2%-5% das cistectomias contemporâneas, são especialmente derivados de tumores isolados com localização preferencial na região do trígono ou parede lateral do órgão, e são predominantemente invasivos. Apenas 0,5% a 2% dos tumores vesicais são

representados por adenocarcinomas e classificados de acordo com o seu local de origem (Shokeir, 2004; Albol-Enein et al., 2007).

Como muitos tumores sólidos, o câncer de bexiga constitui uma patologia característica da população idosa (Fair et al., 1993). Sua incidência aumenta progressivamente com a idade, sendo particularmente alta após os 60 anos (Cohen e Johansson, 1992), com um pico de incidência durante a septuagésima década de vida, quando o risco de desenvolvimento da doença é de 2% a 4% para homens e 0,5% a 1% para mulheres (Kirkali et al., 2005). Tumores vesicais em pacientes com menos de 40 anos são incomuns (Fitzpatrick e Reda, 1986). No Brasil, os cânceres de bexiga urinária ocupam o 7º lugar dentre as neoplasias no sexo masculino e o 10º no sexo feminino (Brasil, INCA, 2005).

O estudo das neoplasias de bexiga constitui um desafio, pois esses tumores exibem vias altamente complexas e um comportamento clínico imprevisível (Mhaweck-Fauceglia et al., 2006). Em relação às descobertas significativas sobre suas origens e avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento, esta patologia permanece com uma alta taxa de morbidade e mortalidade, uma vez que a incidência mundial do câncer de bexiga continua aumentando de 5% a 10% a cada cinco anos (Newling et al., 1995). Além disso, o risco para o desenvolvimento de múltiplos cânceres após o diagnóstico do tumor primário é de 16% (Hayat et al., 2007).

Muitas das características biológicas do carcinoma urotelial, incluindo parâmetros histopatológicos, análises citológicas e marcadores moleculares, têm sido estudadas na tentativa de prever o comportamento do tumor. O estadiamento acurado e graduação da patologia são também importantes para decidir o melhor tratamento (Pelucchi et al., 2006). Todavia, o câncer de bexiga constitui uma doença

heterogênea que apresenta história natural variável mesmo entre tumores semelhantes quanto ao grau ou estadió. Embora essa patologia seja de três a quatro vezes mais comum em homens do que em mulheres, a sobrevivência ajustada ao estadió parece ser pior entre os indivíduos do sexo feminino (Kirkali et al., 2005). Aproximadamente 80% dos TCCs são tumores superficiais, sendo que 10% a 20% dos casos progridem a tumores infiltrativos (Lorenzo-Romero et al., 2003; Knowles, 2007). Cerca de 2/3 de todos os cânceres de bexiga são papilíferos e desenvolvem-se a partir de um epitélio normal ou hiperplásico sem anormalidades nucleares; esses tumores exibem baixa atipia citológica e não são detectados em exames citológicos de urina. Os tumores invasivos, mesmo quando restritos ao tecido sub-epitelial, constituem um fator de pior prognóstico e invariavelmente progridem para estadios mais avançados, na maioria dos casos, infiltrando a camada muscular mais profunda do órgão no período de um ano (Newling et al., 1995), o que determina intervenção médica agressiva, como a cistectomia radical. Por outro lado, a principal característica clínica dos tumores vesicais não invasivos é o seu alto índice de recorrência, com indiferenciação progressiva e aumento da agressividade (Smith, 1999; Koenig et al., 2000).

Diversos fatores estão diretamente relacionados à etiologia dos TCCs. O fator de risco mais bem estabelecido do carcinoma de bexiga é o tabagismo, capaz de aumentar de três a sete vezes a suscetibilidade para o desenvolvimento do tumor, de acordo com a intensidade do hábito (Auerbach e Garfinkel, 1989; Smith, 1999; Pashos et al., 2002). Acredita-se que o tempo de exposição contínua ao tabaco seria o fator de risco preponderante, considerando-se que indivíduos que deixaram de fumar têm uma diminuição gradativa na probabilidade de desenvolver a doença. Embora após 1-4 anos de abstinência o

risco diminuía em 40%, após 25 anos, um ex-fumante ainda apresenta risco aumentado em relação à população em geral (Brennan et al., 2000).

Estudos epidemiológicos têm mostrado a relação entre o número de cigarros consumidos por ano e o aumento do risco para TCC de bexiga, o que também é influenciado pelo tipo de fumo utilizado (Talaska et al., 1991). O mecanismo pelo qual o tabaco induz neoplasias de bexiga ainda não foi totalmente esclarecido, porém pode estar relacionado aos inúmeros compostos químicos existentes na fumaça do cigarro, entre os quais hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas (p.e. 4-aminobifenil) e aldeídos insaturados (Cohen e Johansson, 1992). Foi observado, por exemplo, que indivíduos tabagistas possuem maior instabilidade genômica em células uroteliais (Gontijo et al., 2002) e resposta proliferativa alterada no trato urinário, manifestada pelo franco desenvolvimento de hiperplasias, eventos claramente associados ao aumento no risco para TCCs (Auerbach e Garfinkel, 1989).

A exposição ocupacional é responsável por aproximadamente 20% de todos os tumores de bexiga: trabalhadores das indústrias têxteis, de corantes e borrachas seriam acometidos pelo contato constante com agentes tais como β -naftalina, 4-aminobifenil e benzidina. A exposição a arilaminas, o uso prolongado de analgésicos do tipo fenacetina e a exposição a ciclofosfamida também contribuem para o desenvolvimento da patologia (Berggren et al., 2001). Além disso, pacientes com história de infecção crônica no trato urinário apresentam maior associação com o desenvolvimento de cânceres vesicais, principalmente os do tipo escamoso invasivo, resultantes da ação de nitritos e nitrosaminas da bactéria e/ou do processo inflamatório, que leva ao aumento da proliferação celular e oferece maiores oportunidades de fixação dos danos no DNA (Kirkali et al., 2005). O carcinoma de

células escamosas da bexiga foi associado à infecção por *Schistosoma haematobium*. Essa associação baseia-se em estudos caso/controle e na correlação da incidência tumoral com a prevalência da infecção por *S. haematobium* em diferentes áreas geográficas (El-Rifai et al., 2000).

Ao se considerar o aumento da frequência de lesões uroteliais em pacientes sob acompanhamento ao longo de um ano (Harris e Neal, 1992), com alterações do urotélio macroscopicamente normal variando desde hiperplasias e displasias até carcinomas *in situ* (CIS), ressalta-se a importância do acompanhamento rigoroso e periódico após ressecção do tumor primário, para a detecção precoce de recorrências e para intervenções que objetivem reduzir a morbidade e mortalidade pela doença. Por isso, indivíduos submetidos à ressecção da neoplasia vesical, ao lado de fumantes, de trabalhadores expostos a alguns solventes orgânicos e de portadores sintomáticos de doenças do trato urinário, são considerados como populações de risco para o desenvolvimento de tumores de bexiga (Wallace, 1988; Cohen e Johansson, 1992; Spruck et al., 1993).

Devido ao longo período de latência para o desenvolvimento do carcinoma de bexiga, com algumas lesões ocorrendo mais de 30 anos após a exposição a um agente cancerígeno, sugere-se que o processo aconteça em duas etapas: a primeira, a fixação de uma mutação no DNA; a segunda, a promoção e o crescimento das células alteradas. Em muitos casos o agente iniciador pode ser também o promotor do processo carcinogênico (Newling et al., 1995).

Em dezembro de 1998, diante da necessidade de consenso para as terminologias das lesões de bexiga, que pudessem ser efetivamente utilizadas por patologistas, urologistas e oncologistas, os membros da Organização Mundial de Saúde (WHO) e da Sociedade Internacional de Patologistas e Urologistas (ISUP)

publicaram o *The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder* (Epstein et al., 1998). Este documento abrange não somente as condições neoplásicas, mas, também, a nomenclatura de lesões pré-neoplásicas. No que diz respeito ao epitélio de revestimento da bexiga (bem como de ureteres e pelve renal), este deve ser denominado epitélio urotelial, embora o termo transicional possa ser usado como sinônimo.

Vale ressaltar que o estadiamento é um dos mais importantes fatores determinantes na escolha do tratamento e do prognóstico do câncer de bexiga. Segundo o sistema de estadiamento TNM (tumor, linfonodos e metástases) da *American Joint Committee on Cancer* (Greene, 2002), tumores pT1 são aqueles que invadem a lâmina própria, mas não a camada muscular própria; tumores pT2 invadem a muscular própria; tumores pT3 invadem o tecido perivesical e; tumores pT4 invadem outros órgãos (próstata, útero, vagina, parede pélvica ou parede abdominal).

1.2 Alterações Genéticas e Epigenéticas em Carcinomas Uroteliais

O câncer é uma doença resultante da perda da homeostasia mediada por alterações nas formas de comunicação intra, extra e intercelular que desregulam o balanço estabelecido entre proliferação celular, diferenciação, apoptose e adaptação (Trosko e Ruch, 1998).

Há inúmeras evidências de que as neoplasias humanas, como as induzidas quimicamente em animais de experimentação, ocorrem por meio de um processo de múltiplas etapas, no qual as células se transformam do fenótipo benigno para o maligno (Oyasu, 1995; Hanahan e Weinberg, 2000). Essa evolução

morfológica está associada ao acúmulo de lesões gênicas e cromossômicas que, aparentemente, são as responsáveis pela progressão da neoplasia (Cohen e Ellwein, 1991). As principais alterações genéticas envolvidas na carcinogênese são a ativação de protooncogenes e a inativação de genes supressores de tumor. Entretanto, as alterações epigenéticas, ou seja, padrões alterados de expressão gênica que são mediados por mecanismos que não afetam a seqüência primária de DNA, são também reconhecidas como importante mecanismo no desenvolvimento de uma variedade de cânceres por alterar a expressão de genes críticos (Baylin e Ohm, 2006; Esteller, 2007).

Os protooncogenes são genes que desempenham importante atividade em processos celulares normais como regulação da expressão gênica ou crescimento celular e transdução de sinais citoplasmáticos. Quando alterados, quer por mutação de ponto, amplificação ou translocação, geram os chamados oncogenes, que apresentam fenótipo maligno tanto por super expressar o produto gênico normal como por expressar uma proteína com função alterada. A principal característica desses genes é o “ganho” de função, constituindo um evento “positivo” ou “dominante” (Cordon-Cardo et al., 1997; Baylin e Ohm, 2006). Os genes supressores de tumor (GST), por sua vez, normalmente estão envolvidos com o crescimento celular, ao interromper a continuidade do ciclo de divisão nos *checkpoints* e, assim, inibir a expressão do fenótipo tumorigênico. A inativação ou perda dos produtos dos GSTs, principalmente pela deleção alélica seguida de mutação de ponto no alelo contralateral, remove a barreira de proliferação normal o que pode resultar na transformação maligna das células. Trata-se, portanto, de um evento “negativo” ou “recessivo” (Cordon-Cardo et al., 1997; Luczak e Jagodzinski, 2006).

O desenvolvimento do TCC requer a interação de sucessivos eventos carcinogênicos, desde a ativação de genes que seqüencialmente estimulam a proliferação celular, à inibição de genes supressores que regulam o crescimento e a diferenciação celulares (Lorenzo-Romero et al., 2003). Vários marcadores têm sido utilizados para o estudo das características biológicas das neoplasias uroteliais: alterações em protooncogenes (Zhau et al., 1990; Masui et al., 1991) e em genes supressores de tumor (Cordon-Cardo et al., 1997), aneuploidias (Wheless et al., 1993), alterações na taxa de proliferação celular (Tsujihashi et al., 1991; Malmstrom et al., 1992; Nakopoulou et al., 1998) e na expressão de antígenos sanguíneos ou de histocompatibilidade (Levin et al., 1991) e, finalmente, alteração nos níveis de fatores de crescimento (Okamura et al., 1990). No entanto, isoladamente, nenhum desses eventos permite determinar o comportamento biológico do tumor para fins de prognóstico e intervenção.

A herança epigenética é definida como a informação celular herdada durante a divisão, que não aquela contida na seqüência de DNA. Existem três tipos principais e inter-relacionados dessa herança: a metilação do DNA, o *imprinting* genômico e a modificação das histonas (Feinberg e Tycko, 2004). Em organismos eucariotos superiores, o DNA encontra-se metilado em citosinas localizadas na posição 5' das guaninas no dinucleotídeo CpG (Herman et al., 1996). Este tipo de metilação é conhecido por atuar como uma memória celular e por estar envolvido em vários processos biológicos, como expressão gênica tecido-específica, inativação do cromossomo X, defesa contra parasitas intragenômicos e *imprinting* genômico (Turker e Bestor, 1997; Ushijima et al., 2003), além de constituir evento essencial para o desenvolvimento embrionário normal (Gonzalzo e Jones, 1997; Laird, 2003).

Considerando o importante efeito regulador na expressão gênica, a metilação é especialmente relevante quando envolve áreas ricas em dinucleotídeos CpG conhecidas como ilhas CpG. As regiões promotoras de genes ativamente transcritos, freqüentemente ricas nessa seqüência de dinucleotídeos, são quase invariavelmente não metiladas (Turker e Bestor, 1997). Entretanto, regiões intergênicas que consistem predominantemente em seqüências de elementos moderada e altamente repetitivos, são geralmente metiladas na maioria dos tecidos, assim como a região promotora de alguns genes caracterizados por ausência de expressão (Turker e Bestor, 1997).

Embora o DNA dos vertebrados seja geralmente pobre em relação a esse dinucleotídeo, as ilhas CpG estão presentes nas regiões promotoras e próximas ao primeiro éxon de aproximadamente 40% dos genes (Larsen et al., 1992). Recentemente, Takai e Jones (2002) propuseram novos critérios para caracterizar uma verdadeira ilha CpG, por acreditarem que seqüências de DNA maiores que 500pb com um conteúdo de CG igual ou superior a 55% e CpGobs/CpGesp (freqüência de CpG observada/esperada) de 0,65 são mais prováveis de estarem associadas à região 5' de genes. Assim, nessa nova definição os elementos repetitivos, como as seqüências *Alu*, foram excluídos.

Tendo em vista que muitos processos genômicos podem ser alterados em função da metilação do DNA, acredita-se que modificações nesses padrões podem também estar envolvidas no processo de carcinogênese (Szyf, 2002). Portanto, a metilação é reconhecida como um mecanismo epigenético importante no desenvolvimento de uma variedade de cânceres por alterar a transcrição de genes críticos. Esse evento é investigado e observado há mais de duas décadas, com estudos iniciais desenvolvidos por Gama-Sosa et al. (1983), e

continua sendo documentado que o padrão aberrante em ilhas CpG normalmente não metiladas é relativamente freqüente em células que apresentam crescimento desordenado e naquelas transformadas (Herman et al., 1996).

Dois padrões distintos de alterações no perfil de metilação do DNA foram identificados em células tumorais: a hipometilação generalizada do genoma e a hipermetilação que se apresenta restrita às ilhas CpG. Com base nestes dois padrões, algumas hipóteses foram propostas para inferir o papel funcional das alterações epigenéticas no câncer: a perda da metilação poderia ativar a expressão de protooncogenes quiescentes, retrotransposons, bem como de genes que codificam proteínas envolvidas com a instabilidade genética, estimulando uma cascata de eventos que culminaria com a transformação e metástase de células malignas ou; alternativamente, a metilação aumentada em sítios previamente não metilados, tais como a região promotora ou o primeiro éxon de um gene supressor de tumor, poderia resultar na sua inativação pela inibição da transcrição e conseqüente incapacidade de suprimir a proliferação celular (Herman et al., 1996; Gonzalzo e Jones, 2002; Luczak e Jagodzinski, 2006).

O silenciamento gênico mediado por padrões anormais de metilação de ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras de genes reguladores de crescimento é freqüentemente observado em células cancerosas (Velicescu et al., 2002; Dulaimi et al., 2004). Desse modo, a hipermetilação tem sido considerada o principal mecanismo para o silenciamento de genes supressores tumorais ou de outros genes associados às neoplasias humanas (Hoque et al., 2006). Além disso, níveis alterados de metilação, especialmente hipometilação, podem causar instabilidade genômica e, conseqüentemente, formação de tumores (Fazzari e Greally, 2004; Ushijima, 2005). Portanto, o mapeamento dos padrões de metilação

em ilhas CpG está se tornando uma ferramenta importante para a compreensão tanto da expressão gênica normal como patológica (Herman et al., 1996).

Em tumores onde a hipermetilação é observada, como é o caso dos carcinomas de bexiga, deve-se atentar para o fato de que os mecanismos responsáveis por esse evento epigenético estão alterados, ou seja, pelo menos uma das enzimas sabidamente envolvidas com o processo de metilação (DNA metiltransferase) deve estar desregulada. Além disso, as alterações no metabolismo dos grupamentos metil devem também ser consideradas (Schulz, 1998). Assim, ao estudar os TCCs de bexiga e os tecidos normais adjacentes e não adjacentes (pacientes sem carcinoma), Nakagawa et al. (2003; 2005) sugeriram que a hipermetilação de múltiplas ilhas CpG em associação com a super expressão de DNMT1 (DNA metiltransferase 1) participam da carcinogênese urotelial desde o estágio pré-canceroso e particularmente no desenvolvimento dos carcinomas não nodulares invasivos deste órgão, uma vez que a hipermetilação foi crescentemente observada desde o tecido normal não associado à neoplasia, passando pelo normal adjacente ao tumor, urotélio displásico e tumoral, com o fenótipo metilador (metilação de múltiplas ilhas CpG simultaneamente – CIMP, *CpG island methylator phenotype* – Toyota e Issa, 1999) significativamente maior em carcinomas não papilíferos (carcinomas nodulares invasivos e seus precursores, *in situ*). A super expressão de DNMT1 também foi relacionada ao aumento da metilação em carcinomas nos quais as funções de Rb (retinoblastoma) e p53 (proteína tumoral p53) foram perdidas, como em tumores de células uroteliais (Peterson et al., 2003; McCabe et al., 2005).

Vários estudos demonstraram que as deleções cromossômicas são comuns em cânceres humanos e, para tipos distintos de tumores, parecem ser não

aleatórias. Análises citogenéticas identificaram a perda de material genético em sítios genômicos específicos. No entanto, com a introdução de novas tecnologias, anormalidades mais discretas puderam ser também detectadas. Dentre as alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento do TCC em seres humanos estão as perdas ou as deleções no cromossomo 9, o que parece ocorrer precocemente no processo cancerígeno (Reznikoff et al., 2000). As análises em cânceres de bexiga usando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) demonstraram que as deleções do cromossomo 9 (9p e 9q) ocorrem em mais de 50% dos casos, independentemente do grau e estadiamento (Knowles et al., 1994; Poddighe et al., 1996). Algumas regiões de perda, especialmente em 5p, 8p e 21q, são significativamente associadas a um pior grau e estadiamento (Hussain e James, 2005) e, ainda, as deleções no cromossomo 11, preferencialmente em 11p, estão fortemente relacionadas à progressão tumoral (Gibas et al., 1984). Alterações no número de cópias genômicas detectadas pela metodologia de alta resolução denominada *array*-CGH (*microrray-based Comparative Genomic Hybridization*) também são freqüentes em TCCs de bexiga: as alterações mais comuns compreendem a perda total ou parcial de 4q e ganho em 20q (Hurst et al., 2004). São ainda observadas nas neoplasias de bexiga, entre outras amplificações e mutações, as alterações em genes da família *RAS*, especialmente no oncogene *H-RAS* (11p15.5, *v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) códons 12, 13 e 61, que ocorrem em 10% dos pacientes com tumores vesicais e dobram o risco de recorrências (Gibas et al., 1984; Koenig et al., 2000; Przybojewska et al., 2000; John et al., 2003).

No que concerne à investigação dos padrões de metilação relacionados à recorrência do câncer de bexiga, são poucos os relatos existentes na

literatura e, ainda assim, geralmente abrangem somente aqueles genes que geralmente estão alterados na maioria dos cânceres humanos (Tada et al., 2000, 2002; Dominguez et al., 2002). Existem alguns genes comumente relacionados a parâmetros de pior prognóstico e sobrevivência que apresentam padrão alterado de metilação ou estão localizados em regiões de deleção nos tumores uroteliais de bexiga (Chan et al., 2002; 2003ab; Laronga et al., 2000; Maruyama et al., 2001). Perdas genéticas identificadas em carcinomas de bexiga clínicos envolvendo, entre outras regiões, 1p, 3p, e 16q (Pratt et al., 1992; Knowles et al., 1994; Zang et al., 2004), tornam essas localizações cromossômicas interessantes para análise em relação ao seu envolvimento na patologia urotelial.

1.3 Alterações na Metilação dos Genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*

As interações de adesão entre as células são dinâmicas e reguladas durante o desenvolvimento e homeostase tecidual. Nesse contexto, as caderinas constituem as principais moléculas de adesão célula-célula envolvidas no desenvolvimento e manutenção de tecidos sólidos (Takeichi, 1991). O gene *CDH1* (*cadherin 1, type 1, E-cadherin*) está situado na região 16q22.1 e representa uma forma clássica pertencente à superfamília dessas moléculas. A proteína por ele codificada constitui uma glicoproteína de adesão célula-célula dependente de cálcio, composta por cinco repetições de caderina extracelular, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática altamente conservada. Mutações nesse gene estão correlacionadas ao câncer gástrico, mamário, colorretal, tireoidiano e ovariano (Bex et al., 1998; Piura et al., 2005; Vauhkonen et al., 2006). A perda de sua função parece contribuir para a progressão do tumor ao aumentar a proliferação, invasão e/ou metástase e principalmente porque a perda da adesão entre as células deve

constituir o pré-requisito para o comportamento invasivo dos tumores malignos (Rocha et al., 2003).

Ao investigar o papel do gene *CDH1* durante a progressão e metástase, Rocha et al. (2003) observaram que a perda progressiva da expressão da caderina-E acompanhou a perda de diferenciação em carcinomas de tireóide. Além disso, Kaihara et al. (2003) verificaram que a desdiferenciação das células cancerosas e expressão reduzida de *CDH1* em neoplasias coloretais estavam fortemente relacionadas com a metástase em fígado. Em câncer cervical, a hipermetilação desse gene constitui um potencial marcador para selecionar os pacientes com alto risco de recorrência que podem ser beneficiados pela terapia sistêmica adjuvante (Widschwendter et al., 2004).

Padrões anormais de metilação do gene *CDH1* foram observados em neoplasias mamárias ductais invasivas e foram associados com pior prognóstico (Hu et al., 2002). Azarschab et al. (2002) estudando tumores coloretais, constataram que a região promotora deste gene é alvo de controle epigenético durante a ulceração col retal e, assim, esse evento tem um importante papel na progressão da inflamação crônica para o tumor.

A hipermetilação do gene *CDH1* foi observada em altas frequências nos TCCs de bexiga (84%) (Ribeiro-Filho et al., 2002), desde as formas papilíferas de baixo grau não invasivo (30%) até tumores avançados e infiltrativos (50%) (Bornman et al., 2001). Esse padrão aberrante também foi evidenciado em carcinomas *in situ* (Chan et al., 2002; Horikawa et al., 2003) e em lesões associadas à esquistossomose (Gutierrez et al., 2004), além de estar relacionado a parâmetros de pior prognóstico e sobrevivência (Maruyama et al., 2001). Em estudos envolvendo amostras de sedimento urinário, houve uma prevalência significativa de

metilação naquelas obtidas de pacientes com neoplasias (Pu et al., 2006), chegando a 59,1% em casos pareados com tumores primários (Chan et al., 2002). Linhagens celulares de câncer genitourinário também se apresentaram hipermetiladas (Chung et al., 2001), assim como lesões benignas (18%) (Pu et al., 2006) e tecidos de bexiga histologicamente classificados como normais, especialmente em indivíduos com idade superior a 70 anos (Bornman et al., 2001).

O gene *RARB* (*retinoic acid receptor, beta*), localizado em 3p24, codifica um membro da superfamília de receptores hormonais tiróide-esteróide que atua como regulador transcricional. Esse receptor, encontrado no citoplasma e em compartimentos sub-nucleares, liga-se ao ácido retinóico (forma biológica ativa da vitamina A) que participa da sinalização celular durante a morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular. Acredita-se que esta proteína limita o crescimento de muitos tipos celulares por meio da regulação da expressão gênica (Germain et al., 2006). O gene *RARB* foi primeiramente identificado em carcinoma hepatocelular, onde flanqueia um sítio de integração do vírus da hepatite B (de Thé, 1996).

Níveis reduzidos ou inexistentes de RNAm de *RARB* foram observados em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários (Swisshelm et al., 1994) e em carcinomas de cabeça e pescoço (Xu et al., 1994). Esses resultados indicam que a perda da expressão de *RARB* constitui um evento importante para a tumorigênese, hipótese esta corroborada pelo fato de que *RARB* pode atuar como gene supressor tumoral em linhagens celulares de câncer epidermal de pulmão (Houle et al., 1993) e tumor ginecológico (Sabichi et al., 1998). Deste modo, uma alteração na expressão de *RARB* corresponderia a um dos

eventos que proporcionam às células neoplásicas escapar da regulação de crescimento (Ivanova et al., 2002).

A hipermetilação do gene *RARB* já foi descrita em alguns tipos tumorais, entre os quais o câncer esofágico de célula escamosa, onde desempenha papel importante nos estágios iniciais da carcinogênese (Kuroki et al., 2003), e em carcinoma lobular de mama *in situ* (pré-invasivo) e invasivo, onde comportamento semelhante foi observado para o gene *RASSF1* (Fackler et al., 2003). Nos estudos conduzidos em bexiga, os tumores associados à esquistossomose apresentaram maior índice de metilação para o gene *RARB* (Gutierrez et al., 2004), que foi também encontrado em amostras de TCC (87,7%) e carcinoma *in situ* (50%), e em urotélio normal (42,9%), Entre as amostras de sedimento urinário, 68,2% daquelas pareadas com tumores primários e 23,5% dos controles exibiram níveis aumentados de metilação (Chan et al., 2002).

O gene *SFN* (*stratifin*, anteriormente denominado *14-3-3 sigma*), localizado em 1p36.11, codifica uma proteína que apresenta papel regulador negativo na via de sinalização de glicocorticóides, e que foi primeiramente identificada como um antígeno celular epitelial específico (*HME1*) (Bhatia et al., 2003). Prasad et al. (1992) mostraram que esse marcador epitelial se expressa em baixos níveis em algumas linhagens celulares derivadas de câncer de mama. Relação inversa entre mutações no gene *TP53* e a perda da expressão de gene *SFN* pela hipermetilação de sua região promotora foi encontrada em carcinomas de células escamosas orais (Gasco et al., 2002), observação essa consistente com a atuação da proteína p53 como um regulador do gene *SFN*. Assim, o papel funcional da estratifina na proliferação celular e apoptose pode ser relevante para a regulação

do crescimento e diferenciação (Kunze et al., 2006), atuando de modo semelhante a um gene supressor tumoral.

Em bexiga, a hipermetilação do gene *SFN* foi detectada em 57,1% das amostras de TCC de alto grau e estágio avançado, em 28,6% dos TCCs de baixo grau, em 80% dos carcinomas de células escamosas e em 25% dos carcinomas de pequenas células indiferenciadas (Kunze et al., 2006). O padrão aumentado de metilação em vários tipos histopatológicos sugere a participação desse gene na diferenciação e progressão da neoplasia para fenótipos mais agressivos, bem como para a conversão dos TCCs em carcinomas não uroteliais.

O gene *RASSF1* (*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1*), localizado na região 3p21.3, foi inicialmente identificado pela interação com a proteína XPA que atua no reparo de danos no DNA. A presença de um domínio de associação à proteína ras e a homologia com *Nore1* sugerem que a proteína codificada pelo gene *RASSF1* é capaz de atuar na via de sinalização de ras, possivelmente como um regulador negativo de crescimento celular, sendo, portanto, classificada como proteína similar às proteínas efetoras de ras (Dammann et al., 2000). A instabilidade da região cromossômica contendo o gene *RASSF1* resulta na alta frequência de deleções detectadas principalmente em câncer de pulmão (Agathangelou et al., 2005) e sugere a ação supressora desse gene. Nesse contexto, a perda ou alteração da expressão de *RASSF1* tem sido associada com a patogênese de uma variedade de cânceres.

Deve-se considerar que o gene *RASSF1* pode ser inativado tanto por mecanismos genéticos quanto epigenéticos. A inativação transcricional desse gene foi relacionada a hipermetilação da ilha CpG de sua região promotora em vários tipos tumorais, o que lhe confere papel importante na tumorigênese e no prognóstico

e detecção precoce da patologia, além de ser o evento de inativação epigenética mais frequentemente detectado nas neoplasias humanas (Damman, et al., 2000; 2005).

O silenciamento epigenético do gene *RASSF1* já foi detectado em tumores primários, incluindo os de mama, pâncreas, rim, fígado, cérvix, nasofaringe e próstata, e tem sido considerado evento precoce na patogênese e progressão tumoral de tireóide (Nakamura et al., 2005) e retinoblastoma (Choy et al., 2005). Em tumores mamários a perda de expressão desse gene é um parâmetro independente de pior prognóstico (Yeo et al, 2005; Muller et al., 2004). O padrão alterado de metilação é também frequentemente encontrado em fluidos corporais, incluindo sangue, urina, aspirados nasais, esputos e lavagens bronco-alveolares, além de ter sido sugerida a associação entre a inativação gênica de *RASSF1* e o estágio tumoral avançado de tumores de cérebro, próstata, bexiga, gástricos, pulmonares e sarcomas (Dammann et al., 2005).

Em bexiga, as altas frequências de metilação do gene *RASSF1*, além de estarem relacionadas a vários parâmetros de pior prognóstico (Maruyama et al., 2001; Catto et al., 2005; Marsit et al., 2006), foram observadas em 86% dos TCCs (Catto et al., 2005), em tumores associados à esquistossomose (Gutierrez et al., 2004) e vinculadas à expressão reduzida e perda da heterozigose da região 3p21.3 (Lee et al., 2001; Chan et al., 2003b). A hipermetilação da ilha CpG situada no promotor desse gene, foi encontrada em amostras de mucosa normal adjacente à lesão (42%) (Friedrich et al., 2004), estando fortemente associada à perda da expressão gênica em linhagens celulares (Chan et al., 2003b) e em tumores primários de bexiga (Lee et al., 2001). Em urina, o padrão metilado, embora aumentado em pessoas mais idosas (Friedrich et al., 2004), mostrou-se

significativamente maior em amostras de sedimentos provenientes de pacientes com carcinoma urotelial, mesmo quando comparados a indivíduos controle com idade superior a 70 anos, e a voluntários sadios com menos de 40 anos (Yates et al., 2006). Assim, o silenciamento do gene *RASSF1* parece desempenhar papel crítico na progressão para a malignidade em carcinomas de bexiga humanos (Lee et al., 2001).

1.4 Abordagens Metodológicas para a Identificação de Perfis Diferenciais de Metilação e Determinação de Padrões de Metilação do DNA em Fragmentos Específicos

A compreensão dos eventos moleculares que iniciam e mantêm o silenciamento epigenético pode levar ao desenvolvimento de abordagens clínicas relacionadas à prevenção dos tumores, bem como de terapias capazes de reverter esse evento que conduz a malignidade (Baylin e Ohm, 2006). Deste modo, a investigação das alterações envolvidas com o desenvolvimento neoplásico que acometem a cromatina, tais como a metilação anormal da região promotora de genes críticos, constitui uma estratégia promissora para o estabelecimento de marcadores moleculares capazes de auxiliar no acompanhamento de risco, detecção precoce e prognóstico das diversas patologias (Ushijima, 2005).

A informação referente a metilação contida no DNA genômico original é perdida durante a análise molecular rotineira, a menos que se faça a sua preservação através de uma modificação dependente da metilação do DNA antes da etapa de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), por exemplo. Dentre esses procedimentos de modificação, os mais comuns são a digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis a metilação e a conversão pelo bissulfito

de sódio. Entretanto, o advento de diferentes abordagens metodológicas para a detecção da metilação do DNA tem revelado um conjunto de dados complexos e de difícil interpretação (Siegmund e Laird, 2002).

Inicialmente, ao analisar a metilação, é importante reconhecer que a molécula-alvo é a 5-metil citosina. Em seguida, é necessário determinar se o estudo estará direcionado para: a metilação de ilhas CpG ou outras regiões do genoma; a avaliação de uma ou múltiplas ilhas; a hemi-metilação ou metilação completa; CpGs ligados ou não; um ou múltiplos *loci*. Além de serem considerados a sensibilidade, especificidade e o valor preditivo positivo dos marcadores em questão (Verma et al., 2003).

Segundo Ushijima (2005), os estudos que objetivam a identificação de genes que são inativados pela metilação deveriam se concentrar em regiões genômicas sabidamente responsáveis pelo controle da expressão gênica, pois sendo a condição metilada variável dentro de uma mesma ilha, apenas uma porção relativamente pequena (*core*) abrangendo o sítio de início da transcrição estaria consistentemente associada ao silenciamento gênico. Porém, quando se pretende isolar um marcador para a doença, o efeito sobre a transcrição gênica não deveria ser considerado um fator de exclusão. Acredita-se que o estabelecimento de uma estreita associação entre modificações no padrão de metilação de ilhas CpG específicas e o fenótipo da patologia já seria suficiente para a identificação de novos fatores prognósticos. Assim, é necessário que ilhas CpG particulares sejam selecionadas e incluídas na análise. Neste caso, a associação entre a presença de metilação tumor-específica numa dada ilha CpG fortemente associada com um determinado tipo de neoplasia pode ser um achado prognóstico relevante (Ushijima, 2005).

O **conteúdo** de metilação ou conteúdo de 5-metil citosina constitui uma determinação quantitativa dos níveis globais de metilação do DNA numa amostra, ou seja, a porcentagem de grupos metil que está presente. Essa análise pode ser alcançada através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cromatografia de camada fina, cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC/MS), ensaio de aceitação (captação) de grupos metil ou imunohistoquímica. As abordagens baseadas em HPLC produzem dados que incluem qualquer metilação não-CpG, enquanto que o ensaio *SssI* de aceitação de grupos metil investiga somente a metilação em dinucleotídeos CpG (Siegmund e Laird, 2002).

A avaliação quantitativa de um único dinucleotídeo CpG do genoma em todas as moléculas de DNA presentes numa amostra é conduzida por metodologias denominadas MS-SNuPE (*Methylation-Sensitive Single Nucleotide Primer Extension*), COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*) e pelo seqüenciamento direto do DNA modificado pelo bissulfito de sódio (Verma et al., 2003). Assim, o **nível** de metilação é determinado.

O **perfil** de metilação pode ser alcançado pela análise semi-quantitativa, quantitativa ou qualitativa de múltiplos e independentes dinucleotídeos CpG em um *pool* de DNA. Nesse contexto, a utilidade das enzimas de restrição sensíveis a metilação foi primeiramente reconhecida como uma importante ferramenta. Basicamente, as estratégias requerem a digestão do material genético com enzimas de restrição sensíveis a metilação do DNA e suas isosquizômeras, que atuam independentemente do padrão de metilação da seqüência, seguida da amplificação pela PCR do DNA digerido. Geralmente, utiliza-se a endonuclease *HpaII* que reconhece e cliva o sítio de restrição CCGG, mas que não atua sobre este sítio quando a citosina interna encontra-se metilada (C^{m5}CGG), e a endonuclease

MspI que atua como controle experimental, pois reconhece o mesmo sítio de restrição e cliva tanto na presença quanto na ausência da metilação. A metilação diferencial é observada pela amplificação de uma banda específica no DNA digerido com *HpaII* e ausência de amplificação no DNA digerido com *MspI* (Szabó et al., 2000).

A técnica de MS-AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*) (Liang et al., 2002) envolve a digestão do DNA com estas enzimas antes da amplificação pela PCR. Esta metodologia é sensível e rápida para a detecção de perfis anormais de metilação pela comparação direta do conjunto de fragmentos amplificados a partir do DNA tumoral com o conjunto de fragmentos obtidos a partir do DNA normal pareado após a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida. Contudo, geralmente o número de bandas analisadas em um gel é limitado, o que indica a necessidade de se avaliar um número significativo de amostras e de diferentes conjuntos de oligonucleotídeos arbitrários. Além disso, o número de sítios de restrição reconhecidos também é limitado. A principal enzima sensível a metilação utilizada na MS-AP-PCR é a *HpaII*, como já mencionado. Em estudos realizados por Fazzari e Greally (2004) evidenciou-se que apenas 3,9% dos dinucleotídeos CpG do genoma humano estariam incluídos em sítios *HpaII* situados sobre seqüências únicas (genes); a maioria deles estaria localizada em seqüências repetitivas. Apesar destas limitações, a MS-AP-PCR permitiu a identificação de padrões de metilação diferenciais em células tumorais em genes específicos, como a do éxon 5 do gene *PAX6*, em cânceres de cólon, bexiga e próstata (Liang et al., 1998).

A abordagem metodológica denominada MS-RDA (*Methylation-Sensitive Representational Differences Analysis*) baseia-se em um protocolo de

hibridação subtrativa capaz de realizar uma varredura genômica que conduz ao isolamento de genes e segmentos de DNA com alterações no seu padrão de metilação. Entretanto, esse método é bastante laborioso e apresenta uma série de restrições. O maior problema está relacionado à ineficiência das múltiplas reações de digestão e ligação que podem levar a formação de falso-positivos (Li et al., 2002). Muitas seqüências obtidas através desse método correspondem a fragmentos de DNA altamente repetitivo, portanto, não representam genes funcionais, comprometendo o resultado final (Müller et al., 2001). Já a MCA (*Methylation CpG island Amplification*), embora seja útil tanto para a análise de metilação quanto para a clonagem de genes diferencialmente metilados no câncer ao permitir que ilhas CpG diferencialmente metiladas sejam amplificadas e isoladas em tecidos tumorais e normais, essa técnica apresenta desvantagens pois exige um DNA de alta qualidade, compreende apenas um número limitado de sítios CpG dentro das ilhas CpG e é sensível à digestão incompleta pela endonuclease de restrição sensível à metilação empregada (Toyota et al., 1999).

A metodologia de ICEAMP (*Identification of CGI Exhibiting Altered Methylation Patterns*) seleciona regiões ricas em dinucleotídeos CpG (*CGI – CpG Islands*) metilados após a digestão do DNA com enzimas sensíveis à metilação, amplificação pela PCR e separação das seqüências pertencentes unicamente ao tumor através de uma hibridação subtrativa. Após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, a presença de um “rastros” de bandas no *fingerprinting* obtido significa que o sítio de restrição naquele fragmento estava metilado (Brock et al., 2001). Faz-se então a clonagem desses fragmentos para que uma biblioteca de seqüências possa ser gerada, bem como o seqüenciamento destas visando sua identificação no genoma.

As metodologias de varredura, no entanto, impõem limitações relacionadas ao tamanho e complexidade do genoma em estudo, ao número de seqüências repetitivas e ao tamanho relativamente pequeno dos insertos passíveis de clonagem após as sucessivas digestões enzimáticas. Além disso, a melhor caracterização dos genomas permite estimar que 22% dos sítios *HpaII* estão localizados em ilhas CpG no genoma humano e que a proporção de sítios CpG que estão localizados dentro de sítios *HpaII* é de 8,04% (4,14% em elementos transponíveis e 3,9% em seqüências únicas), estando a maioria deles localizada em seqüências repetitivas. Adicionalmente, verifica-se que 50% dos sítios *HpaII* estão localizados em transposons. Estes valores são menores do que a fração de sítios *HpaII* metilados estimados anteriormente e indicam que muitos sítios *HpaII* localizados em seqüências únicas são metilados em um determinado tipo de tecido (Fazzari e Greally, 2004).

Alternativas para se contornar essas importantes limitações metodológicas seria o uso combinado de enzimas de restrição ou a identificação de diferenças de metilação em sítios *NotI* (5'GCGCCGGCC3'). Ao combinar duas ou três enzimas de restrição que preferencialmente tenham seus sítios de corte dentro das ilhas CpG, praticamente todos os fragmentos diferencialmente metilados poderiam ser avaliados (Li et al., 2002a). Embora a ocorrência de sítios *NotI* seja ainda mais limitada em termos de representação quando comparada à dos sítios *HpaII*, a maioria destes está localizada em seqüências únicas (75% dos sítios no genoma humano), dos quais 3/4 estão dentro de ilhas CpG e estão em associação a genes funcionais. Assim, os sítios *NotI* podem atuar como marcadores úteis para a detecção de alterações de metilação tumor-específica. Estima-se que o genoma

humano contém entre 15.000-20.000 sítios *NotI*, dos quais 6.000-9.000 seriam não metilados em um dado tipo tumoral (Li et al., 2002).

A determinação de perfis diferenciais de metilação representa a primeira etapa na identificação de novos marcadores epigeneticamente silenciados no câncer. Vale ressaltar que o termo “perfil de metilação do DNA” é usado para indicar tanto a quantidade de metilação em um único dinucleotídeo CpG, quanto a informação de múltiplos *loci* ou múltiplos CpGs em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (Siegmund e Laird, 2002).

A MSP ou MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) constitui a principal técnica utilizada na detecção do **padrão** de metilação das ilhas CpG em fragmentos específicos. Nesta metodologia, em que se avaliam múltiplos dinucleotídeos CpG ligados ou uma combinação particular de CpGs em moléculas individuais, é realizada a modificação do DNA induzida pelo bissulfito de sódio, sob condições em que os resíduos de citosina são convertidos à uracila, mas a 5-metil citosina permanece não reativa (Frommer et al., 1992). A seqüência sob investigação é então amplificada pela PCR com dois conjuntos de iniciadores específicos para cada fita permitindo a discriminação dos alelos metilados dos não metilados. Por ter como base a reação em cadeia da polimerase, a MSP é sensível e rápida na detecção de alelos metilados, permitindo o estudo a partir de amostras pequenas e a análise de um grande número de casos, especialmente quando seqüências genômicas alvo já foram identificadas (Herman et al., 1996). *MethyLight* é uma abordagem alternativa dessa técnica que faz uso de fluorescência (Verma et al., 2003). Um método que pode fornecer a análise mais direta do que a MSP dos sítios CpG localizados em uma região definida é o seqüenciamento do DNA modificado pelo bissulfito de sódio de moléculas clonadas, no qual pode-se detectar

e quantificar o nível de metilação das citosinas individuais no DNA genômico (Millar et al., 2002).

Para avaliar se a metilação na região promotora de genes supressores tumorais é um evento precoce no processo de transformação maligna, devem ser analisadas lesões pequenas e pré-cancerosas. Entretanto, a maioria desse material encontra-se disponível apenas em arquivos, fixados em formalina ou incluídos em parafina. Assim, há a necessidade de uma metodologia altamente sensível para a análise de tais biópsias, uma vez que o DNA, nessas condições, já está parcialmente degradado (Lehmann et al., 2001).

Nesse contexto, o uso da microdissecção a *laser* constitui-se em uma ferramenta bastante valiosa, pois permite a obtenção de células tumorais e normais a partir de uma mesma biópsia, fazendo com que cada amostra investigada tenha seu próprio controle. Além disso, a possibilidade de se obter separada e individualmente células tumorais e normais diminui a chance de resultados falso-negativos por evitar a contaminação com DNA distinto daquele que se quer estudar.



2 Justificativa e Objetivos

Estima-se a existência de aproximadamente 45.000 ilhas CpG no genoma humano (Antequera e Bird, 1993). Em estudo recente, Costello et al. (2000), avaliaram simultaneamente o *status* de metilação de 1.184 ilhas em 98 tumores primários por meio de uma abordagem genômica, e demonstraram que, em média, 600 ilhas CpG são hipermetiladas por tumor, inclusive em lesões em estágios iniciais. Os padrões não-casuais encontrados, bem como a heterogeneidade intra e inter tumoral sugerem que os tumores podem apresentar subtipos de padrões de metilação distinguíveis. Assim, no presente estudo lançamos a hipótese de que alterações no padrão de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* seriam capazes de estabelecer a distinção entre os subtipos de carcinomas uroteliais. Para tanto, propusemos:

- determinar os padrões de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* no DNA de tecidos tumorais obtidos a partir de biópsias de pacientes com carcinoma de bexiga de alto e baixo grau;
- relacionar os padrões detectados com parâmetros clínico-histológicos do carcinoma de bexiga.

Os TCCs, que correspondem a 90% das neoplasias de bexiga, apresentam elevada taxa de recorrência, ao redor de 50% a 80%, aparentemente devido à tendência difusa do urotélio em sofrer transformação neoplásica (Badalament et al., 1987; Ro et al., 1992). Deste modo, aproximadamente 2/3 dos pacientes diagnosticados apresentarão recorrência em um período de dois anos. O tumor primário representa um importante componente desta tendência, e numerosos focos de urotélio anômalo coexistem ou poderão surgir, quando a neoplasia primária

é diagnosticada. Vários métodos para acompanhamento de pacientes de risco e para a detecção precoce da recorrência de neoplasias vesicais foram propostos. Dentre eles, destaca-se o exame citológico em células da urina miccional ou de lavado vesical, realizado por ocasião da cistoscopia (Kern, 1985; 1997). O lavado vesical com solução salina aumenta a amostra celular e diminui a taxa de falso-negativos, sendo particularmente útil quando as lesões pré-malignas e pré-invasivas não são detectáveis pela cistoscopia (Ahmed, 1987). Assim, levantamos a hipótese de que a identificação da hipermetilação na região promotora dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* em células obtidas a partir de lavados vesicais seria um método menos invasivo para o acompanhamento de pacientes de risco para o desenvolvimento de neoplasia de bexiga e também para a detecção precoce da recorrência tumoral. Deste modo, objetivamos:

- investigar alterações no padrão de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* no DNA de células esfoliadas da bexiga obtidas a partir de lavados vesicais de pacientes com e sem história de TCC prévio;
- comparar as eventuais alterações epigenéticas observadas na avaliação dos lavados com aquelas apresentadas pelo tumor primário e/ou recorrência anterior, no caso dos pacientes em acompanhamento;
- relacionar os padrões de metilação com o comportamento biológico do urotélio (recorrência e graduação do tumor).

Ao considerarmos que metodologias de triagem genômica para a detecção de perfis alterados de metilação tumor-específica representam uma estratégia alternativa para a identificação de novos marcadores tumorais (Ushijima,

2005), sugerimos que a determinação de perfis diferenciais de metilação obtidos a partir de populações celulares homogêneas, normais e tumorais, permitiriam a identificação de um novo biomarcador para o TCC de bexiga. O estabelecimento de um novo biomarcador para padrões alterados de metilação em células uroteliais isoladas do tumor proveria uma metodologia auxiliar sensível para o acompanhamento/monitoramento de indivíduos com risco aumentado para o desenvolvimento de TCC, permitindo a detecção precoce, diagnóstico molecular de ressecções e quimioprevenção adequada, como proposto por Laird (2003).

A partir dessas possibilidades, nos empenhamos em:

- realizar a microdissecção a *laser* de células tumorais e normais adjacentes ao carcinoma de bexiga;
 - otimizar um método de *screening* genômico que possibilite a obtenção de perfis exibindo os fragmentos diferencialmente metilados entre ambos os tipos celulares;
 - identificar novo biomarcador para o TCC de bexiga, a partir das diferenças nos perfis de metilação entre células tumorais e normais.
-



3 Material e Métodos

Os Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu – SP (Anexo I) e do Hospital Amaral Carvalho de Jaú – SP (Anexo II), bem como o CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), aprovaram a realização deste estudo (Anexo III).

3.1 Coleta de Amostras

3.1.1 Material a fresco

Um total de 76 amostras pareadas de tecido tumoral (codificados como TCC) e normal adjacente ao tumor de bexiga (codificados como NB) (Anexo IV) foi coletado no Serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú – SP, após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo paciente (Anexo V). Para a uniformização dos critérios de diagnóstico e classificação, as amostras foram incluídas em parafina para posterior confecção de lâminas e reavaliação histopatológica, segundo as determinações da WHO/ISUP (Epstein et al., 1998; Anexo VI). Dependendo da quantidade de tecido disponível, um fragmento foi armazenado a -70°C , em criotubo devidamente codificado (57 fragmentos de TCC e 56 fragmentos de NB).

3.1.2 Obtenção de células uroteliais a partir de lavados vesicais

Cinquenta e duas amostras de lavados vesicais de pacientes com histórico de neoplasia de bexiga ou com suspeita de câncer vesical foram obtidas durante o acompanhamento de rotina no Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu – SP (Anexo VII). O volume

coletado (aproximadamente 1-1,5 ml) foi centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular submetido à etapa de extração de DNA.

3.1.3 Amostras incluídas em parafina

Os pacientes submetidos ao exame citoscópico, cujos lavados vesicais foram utilizados neste estudo, que apresentavam uma amostra do tumor primário e/ou outras recorrências prévias incluídas em parafina e mantidas nos arquivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP, tiveram a(s) mesma(s) também avaliada(s). A partir daí foram selecionadas 39 amostras teciduais incluídas em parafina. Inicialmente, foram feitos de cinco a quinze cortes histológicos sucessivos, com 20 µm de espessura (variando a quantidade em função da quantidade de tecido incluído), os quais foram desparafinizados com xilol e, após secagem do sedimento em temperatura ambiente, submetidos à etapa de extração de DNA.

3.2 Microdissecção a *laser*

Para a realização da microdissecção a *laser* foram realizados cortes histológicos sucessivos com 5 µm de espessura. As lâminas confeccionadas foram coradas com Azul de Toluidina. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de xilol 100% durante dois minutos, por duas vezes, e, em seguida, foram mergulhadas em etanol 100% por dois minutos e em soluções de etanol 95% e 75%, um minuto cada. Após 30 segundos em água destilada, as lâminas foram coradas com a solução de Azul de Toluidina 0,5%, durante aproximadamente cinco segundos, e

novamente imersas em etanol 75% e 95% por 30 segundos, e em etanol 100% por um minuto duas vezes, para a desidratação do material. Finalmente, as lâminas passaram por outros dois banhos de xilol 100%, cinco minutos cada.

Terminada a coloração, as lâminas permaneceram armazenadas em temperatura ambiente. A obtenção de populações homogêneas de células normais e tumorais foi possível pela microdissecção do tecido no equipamento *Pix Cell II Laser Capture Microdissection* (Arcturus, Inc., Califórnia, EUA), no qual aproximadamente 1.500-6.000 células (tumorais ou normais adjacentes ao tumor) foram capturadas.

3.3 Cultivo Celular

As linhagens celulares 5637 e T24, derivadas, respectivamente, de TCC de bexiga de alto grau e de TCC de bexiga de alto grau invasivo, foram obtidas do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e permaneceram armazenadas (alíquotas de 1×10^6 células/ml) em solução de congelamento contendo glicerol a 10%, em nitrogênio líquido (-195 °C). No momento do uso, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamadas, em frascos de cultura de 25 cm³ (Corning). Nas culturas, incubadas em estufa a 37°C e 5% CO₂, utilizou-se os meios de cultivo DMEM+F10 (Sigma) e RPMI (Sigma), respectivamente para as linhagens 5637 e T24, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e antibióticos (estreptomicina 1% e penicilina 1%), pH 7,4. Ao atingirem o estado de confluência, as células foram subcultivadas. Para isso, o meio de cultura foi retirado e foram acrescentados 5 ml de solução de Hanks 1x, por dois minutos. Após esse período a solução de Hanks foi descartada e foram acrescentados 2 ml da solução de 0,25% tripsina/EDTA 1x (Invitrogen), durante cinco minutos ou até o desprendimento das células, quando, então, foram

adicionados 2 ml de meio completo para a inibição da tripsina. Os experimentos foram conduzidos com as células em crescimento exponencial, após o terceiro subcultivo.

Um frasco, em que as células apresentavam total confluência, foi subcultivado em outros três, todos contendo o mesmo número de células. Após 24 horas foi feita a coleta das células de um dos frascos; os demais tiveram seus meios de cultura descartados, as células aderidas lavadas com solução de Hanks, e novo meio completo foi adicionado. Após 48 horas do início do experimento, as células de outro frasco foram coletadas, permanecendo o terceiro frasco na estufa, com o meio de cultivo trocado. Vinte e quatro horas após atingirem confluência, as células deste último frasco foram também coletadas.

As células resultantes de cada colheita foram transferidas para um microtubo de 1,5 ml e centrifugadas a 9.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma nova porção de meio/células foi adicionada ao microtubo, que foi novamente submetido à centrifugação. Este procedimento foi realizado até que todo o conteúdo de cada frasco fosse esgotado. Posteriormente, os sedimentos celulares foram submetidos ao processo de extração de DNA.

3.4 Extração de DNA

3.4.1 Material a fresco

A extração do DNA dos tecidos normal e tumoral de bexiga foi conduzida pela desagregação mecânica e enzimática do tecido adicionando-se 50 µl de proteinase K (concentração final de 10 µg/ml) e 50 µl de SDS 10% ao tampão de extração contendo 100 mM de Tris pH 8,0, 50 mM de EDTA e 75 mM de NaCl. O

tubo foi invertido suavemente e incubado, *overnight*, a 37°C, Foi adicionado 0,5 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e procedeu-se a homogeneização por um minuto. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga, no qual foi adicionado 0,5 ml de clorofórmio. O tubo foi agitado por um minuto e novamente centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos. Este procedimento foi repetido mais uma vez e, então, o sobrenadante restante foi transferido para outro tubo estimando-se o volume da amostra. Foi adicionado 10% deste volume de acetato de amônio 5 M e quatro a cinco volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi precipitado em *freezer* -70°C durante aproximadamente uma hora e, depois, centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos. O DNA foi lavado em etanol 70%, o álcool foi descartado e os tubos mantidos invertidos para secar o sedimento em temperatura ambiente. Depois de seca, a amostra foi ressuspensa em 80 µl de água ultrapura estéril e conservada em *freezer* a -20°C. A quantidade e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas pela da leitura em espectrofotômetro.

3.4.2 Lavados vesicais, tecido incluído em parafina e linhagens celulares

A extração de DNA do material obtido a partir dos lavados vesicais, das amostras incluídas em parafina (arquivo) e das linhagens celulares foi conduzida da mesma maneira já descrita para o material *a fresco*, diferindo apenas na quantidade de alguns reagentes: **A)** lavados vesicais: 10 µl de proteinase K na concentração final de 100 µg/ml, 10 µl de SDS 20% e 80 µl de tampão de extração contendo 100 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA e 75 mM de NaCl. Posteriormente, a fenolização foi realizada com o auxílio de *Phase Lock Gel Light*

(Eppendorf), quando se empregou 150 μ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e de clorofórmio em etapas subseqüentes. Após o sedimento ter permanecido em temperatura ambiente para secar, foi ressuspendido em 20 μ l de tampão de eluição contendo 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA; **B)** amostras parafinadas: 20-40 μ l de proteinase K (dependendo da quantidade de material) na concentração final de 100 μ g/ml, 30 μ l de SDS 20% e 250 μ l de tampão de extração contendo 100 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA e 75 mM de NaCl. Posteriormente, 350 μ l de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e de clorofórmio em etapas consecutivas. Depois de seco em temperatura ambiente, o sedimento foi ressuspendido em 30 μ l de tampão de eluição contendo 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA; **C)** linhagens celulares: 20-30 μ l de proteinase K na concentração final de 100 μ g/ml, 10-15 μ l de SDS 20% e 80-140 μ l de tampão de extração contendo 100 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA e 75 mM de NaCl (os volumes variaram de acordo com a quantidade do sedimento obtido). A fenolização foi realizada da mesma maneira para os lavados vesicais. Depois de secos em temperatura ambiente, os sedimentos foram ressuspendidos em tampão de eluição contendo 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA.

3.4.3 Células microdissecadas

A extração do DNA obtido a partir de células microdissecadas foi conduzida pela desagregação enzimática adicionando-se 20 μ l de proteinase K na concentração final de 10 μ g/ml, 10 μ l de SDS 20% e 80 μ l de tampão de extração contendo 5 mM de Tris-HCl pH 8,0; 12,5 mM de EDTA e 50 mM de NaCl. O tubo foi homogeneizado suavemente e incubado invertido para que o material pudesse se

desprender da película presente na superfície do *Cap*, a 37°C, *overnight*. Em seguida, as amostras foram transferidas para microtubos *PhaseLock Gel Light* (Eppendorf) de 0,5 ml, no qual foram adicionados 150 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), procedeu-se a homogeneização por um minuto e centrifugação a 14.000 rpm por 20 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 150 µl de clorofórmio e homogeneizados por um minuto, quando foram novamente centrifugados a 14.000 rpm durante 20 minutos. Após esse procedimento, o sobrenadante restante foi transferido para um tubo de 0,5 ml e o volume da amostra foi estimado. Adicionou-se 10% deste volume de acetato de amônio 5 M, aproximadamente três a quatro volumes de etanol absoluto gelado e 1 µl de glicogênio a 20 µg/ml como carreador. O DNA foi precipitado em *freezer* a -20°C, *overnight*. Após centrifugação a 14.000 rpm durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e os microtubos foram mantidos invertidos para secar o sedimento de DNA em temperatura ambiente. Depois de seca, a amostra foi conservada em *freezer* -20°C até sua posterior utilização.

3.5 Modificação do DNA pelo Bissulfito de Sódio

Aproximadamente 1 µg do DNA genômico conservado em *freezer* -20°C foi diluído em água ultrapura estéril para completar um volume final de 17 µl. Este DNA foi desnaturado pela adição de 3 µl de uma solução de NaOH 3 M (para obter uma concentração final de 0,3 M) a 40°C durante 15 minutos, ao abrigo da luz. Foram adicionados 208 µl da solução de bissulfito de sódio 4 M / uréia 6,25 M e 12 µl de hidroquinona 10 mM (concentração final de 0,5 mM) ao DNA. Ambas as soluções foram preparadas no momento do uso. O conteúdo foi gentilmente

homogeneizado por inversão e submetido a 20 ciclos de 15 minutos a 55°C, separados por um período de desnaturação de 30 segundos a 95°C em um termociclador PTC-200 (*MJ Research, Inc. Massachusetts. USA*)(modificado de Paulin et al., 1998).

3.5.1 Purificação do DNA modificado pelo bissulfito de sódio

Ao DNA resultante do processo de modificação pelo bissulfito de sódio foi adicionado 1 ml de resina (*Kit Wizard DNA Clean-Up System - Promega*), e homogeneizado por inversão. Em seguida, utilizando-se o equipamento *Vaccum Manifold* (Promega), uma seringa de 3 ml desprovida de êmbolo foi adaptada a uma mini-coluna e o DNA ligado à resina foi a ela transferido; aplicou-se vácuo para que o DNA pudesse ficar retido na membrana da mini-coluna. Adicionou-se, então, 2 ml de isopropanol 80% à seringa; aplicou-se vácuo novamente. Após desconectada, a mini-coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 ml e centrifugada a 14.000 rpm durante três minutos para remoção do excesso de álcool. A eluição foi realizada pela adição de 40 µl de água ultrapura estéril (pré-aquecida a 65-80°C) à mini-coluna. Passado um minuto, centrifugou-se a mini-coluna adaptada ao tubo de microcentrífuga durante três minutos para que o DNA pudesse ser recuperado. A mini-coluna foi removida e descartada.

A modificação do DNA foi completada pela adição de 5 µl de NaOH 3 M, a temperatura ambiente por 15 minutos para a dessulfonação das uracilas. A precipitação foi realizada pela adição de 30 µl de acetato de amônio 5 M (pH 7,0) aguardando cinco minutos para a completa desaminação. Na seqüência, foram acrescentados 350 µl de etanol 100% gelado e 1 µl de glicogênio (20 µg/ml), e o

DNA foi incubado a -20°C , *overnight*. Para a ressuspensão, este conteúdo foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente. Depois de removido o sobrenadante, os microtubos foram mantidos invertidos para secar o sedimento de DNA. Após a secagem, o precipitado foi ressuspendido em 20 μl de tampão de eluição estéril e mantido a temperatura ambiente por aproximadamente uma hora. Foram utilizados 5 μl deste DNA em cada reação de amplificação pela PCR.

3.6 Análise do Padrão de Metilação dos Genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*

O DNA, depois de modificado e purificado, foi utilizado para a avaliação do padrão de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* pela utilização de pares de oligonucleotídeos específicos para as seqüências metilada e não metilada.

Os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados com base na literatura. Tanto a seqüência dos *primers* quanto as condições de amplificação estão descritas na Tabela 1. Para o gene *CDH1*, foi utilizada uma abordagem do tipo *nested PCR* (*Polymerase Chain Reaction*), na qual as reações ocorreram em um volume de 25 μl contendo 0,25 μM de cada iniciador, 200 μM de cada dNTP, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl_2 e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). Nas reações de MSP dos demais genes, também preparadas em um volume final de 25 μl , estavam presentes 0,25 μM de cada *primer*, 200 μM de cada dNTP, 15 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1 U de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). As concentrações de MgCl_2 variaram de

acordo como segue: 1,5 mM para o gene *CDH1*, 2,5 mM para o gene *SFN* e 3 mM para os genes *RARB* e *RASSF1*.

Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coloração com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994). Controles negativos foram incluídos em cada ensaio.

A análise e interpretação dos resultados foram realizadas através de uma abordagem qualitativa, segundo a presença ou ausência de produto amplificado após a eletroforese.

Tabela 1. Iniciadores e condições de amplificação para os genes incluídos na análise de MSP.

Iniciadores / Referência	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho do amplicon (pb)
CDH1 (Corn et al., 2001)		
PCR 1		
BIS 1 5'- ACTACAACCTCCAAAAACCCATAACTAA -3'	50	270
BIS 2 5'- GTTTTGTTTTGGGGAGG GGTT -3'		
PCR 2 (<i>Nested</i>)		
U1 5'- TGGTTGTAGTTATGTATTTATTTTTAGTGGTGTT -3'	53	U – 120
U2 5'-ACACCAAATACAATCAAATCAAACCAA-3'		
M1 5'- TGTAGTTACGTATTTATTTTTAGTGGCGTC -3'		M – 112
M2 5'- CGAATACGATCGAATCGAACCG -3'		
RARB (Evron et al., 2001)		
U1 5'- GGATTGGGATGTTGAGAATGT -3'	55	U – 158
U2 5'- CAACCAATCCAACCAAACAA -3'		
M1 5'- GAACGCGAGCGATTTCGAGT -3'		M – 143
M2 5'- GACCAATCCAACCGAAACG -3'		
SFN (Ferguson et al., 2000)		
U1 5'- ATGGTAGTTTTTATGAAAGGTGTT -3'	56	U – 106
U2 5'-CCCTCTAACCACCCACCACA-3'		
M1 5'- TGGTAGTTTTTATGAAAGGCGTC -3'		M – 104
M2 5'- CCTCTAACCGCCACCACG -3'		
RASSF1 (Burbee et al., 2001)		
U1 5'- GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG -3'	55	U e M – 170
U2 5'- CACTAACAAACACAAACCAAAC -3'		
M1 5'- GGGTTTTGCGAGAGCGCG -3'		
M2 5'- GCTAACAAACGCGAACCG -3'		

U1 e U2 – par de oligonucleotídeo usado para a amplificação do alelo não metilado.

M1 e M2 – par de oligonucleotídeo usado para a amplificação do alelo metilado.

3.7 MS-AP-PCR (*Methylation-Specific Arbitrarily Primed PCR*)

Para a realização da MS-AP-PCR, aproximadamente 1 µg de DNA tumoral e normal de bexiga foi digerido isoladamente com as enzimas de restrição *Rsal* (20U) e em combinações *Rsal/Mspl* e *Rsal/Hpall* durante 16 horas à 37°C. Em seguida, esse DNA foi submetido a ampliações empregando-se oligonucleotídeos iniciadores de 20 *mers* e 10 *mers* num total de 14 combinações (Tabela 2). As reações foram realizadas num volume de 25 µl contendo 240 mM de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl pH 8,4, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen).

As condições da amplificação estão descritas na Tabela 2.

Os produtos de amplificação foram separados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, contendo ou não 7 M de uréia (aproximadamente 35 cm de corrida, *overnight*, 180 V) e visualizados após coloração com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994).

Sob as condições testadas, observou-se que maior número de bandas diferencialmente metiladas entre o tecido normal e tumoral foi obtido a partir da reação na qual foram empregados os três oligonucleotídeos de 20 *mers*, assim, foi essa a combinação empregada nas avaliações subseqüentes.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores empregados na análise de MS-AP-PCR e as combinações nas quais foram avaliados.

Oligonucleotídeos / Referência	Condições da PCR
20 mers (Gonzalzo et al., 1997)	
(1) MLG2 5'- AAC TCC CAC TCC AAC CCC GG -3'	1 ciclo: 94°C, 2 min
(2) MGC0 5'- AAC TCC CAC TCC AAC CGC GC -3'	5 ciclos: 94°C, 30 seg
(3) MGF2 5'- AAC TCC CAC TCC AAC CCG CG -3'	40°C, 1 min
Combinações	72°C, 90 seg
- únicos: (1); (2); (3)	30 ciclos: 94°C, 15 seg
- duplas: (1+2); (1+3); (2+3)	55°C, 15 seg
- trio: (1+2+3)	72°C, 1 min
	1 ciclo: 72°C, 4 min
	15°C ∞
10 mers (Liang et al., 2002)	
(4) Bs11 5'- GAG AGG CGC G -3'	1 ciclo: 94°C, 5 min
(5) Bs12 5'- GCC CCC GCG A -3'	34 ciclos: 94°C, 2 min
(6) Bs13 5'- CGG GGC GCG A -3'	40°C, 1 min
Combinações	72°C, 2 min
- únicos: (4); (5); (6)	1 ciclo: 72°C, 10 min
- duplas: (4+5); (4+6); (5+6)	15°C ∞
- trio: (4+5+6)	

3.8 Análise e Interpretação dos Resultados da MS-AP-PCR

As bandas candidatas a metilação diferencial foram identificadas diretamente pela comparação entre os produtos amplificados a partir do DNA normal e tumoral das três clivagens enzimáticas (Figura 1).

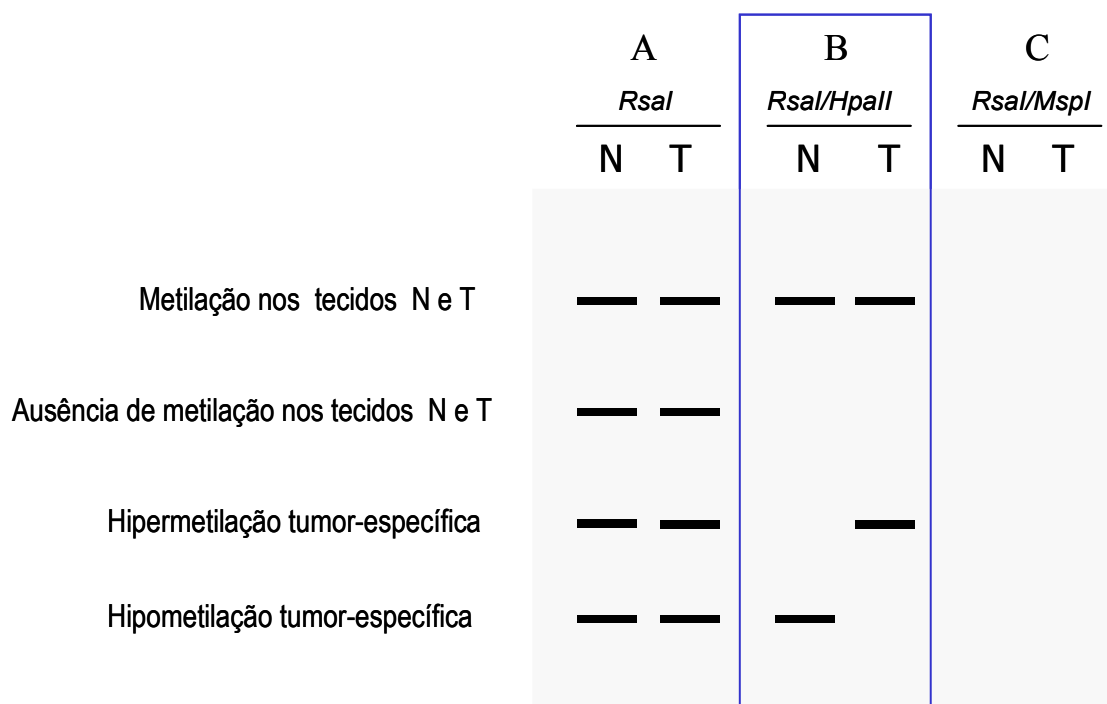


Figura 1. Interpretação dos resultados da MS-AP-PCR. A metilação diferencial é observada pela amplificação de uma banda específica no DNA digerido com *HpaII* (B) e ausência de amplificação no DNA digerido com *MspI* (C). Para o par DNA normal (N) e DNA tumoral (T) a detecção de um produto apenas no perfil exibido pelo tubo duplamente digerido com *HpaII* (B) no DNA tumoral indica a hipermetilação tumor específica e a ausência de um produto no perfil do DNA tumoral indica a perda de metilação nas células tumorais.

A comparação do perfil de bandas entre a mesma amostra amplificada após a digestão com as endonucleases sensível e não sensível a metilação do DNA (*HpaII* e *MspI*, respectivamente) permite a identificação de fragmentos de DNA contendo dinucleotídeos CpG em sítios 5'CCGG3' diferencialmente metilados. Como etapa seguinte, buscou-se a recuperação e a

reamplificação destes fragmentos para posterior clonagem e identificação após o seqüenciamento. As bandas diferencialmente metiladas entre o tecido normal e tumoral de um dado caso foram recortadas do gel com o auxílio de uma agulha estéril e colocadas em um microtubo. Foram utilizadas algumas estratégias para a recuperação das bandas. A primeira seguiu o protocolo recomendado pelo *kit Wizard PCR Preps DNA Purification* (Promega): 100 μ l de tampão TE (10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) foram adicionados ao fragmento de gel contendo a banda de interesse e incubou-se o microtubo a 37°C por 30 minutos para eluição passiva. Em seguida, transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo e acrescentou-se 1 ml de resina. Uma mini-coluna foi adaptada ao equipamento *Vacuum Manifold* (Promega) e a ela acoplou-se uma seringa (desprovida de êmbolo) para onde o conteúdo do microtubo foi transferido. Aplicou-se vácuo até que todo o conteúdo passasse pela mini-coluna, em seguida foram adicionados 2 ml de isopropanol 80% para a lavagem e fixação do DNA à resina. A seringa foi então descartada e a mini-coluna transferida para um microtubo, submetido à centrifugação por dois minutos a 14.000 rpm. Novamente a mini-coluna foi transferida para um novo microtubo e 30 μ l de água ultrapura estéril pré-aquecida foram a ela adicionados. Após a espera de um minuto em temperatura ambiente, procedeu-se à centrifugação a 14.000 rpm por um minuto para que o DNA pudesse eluir da resina contida na mini-coluna.

Para a identificação do fragmento, realizou-se uma nova PCR utilizando-se o DNA recém recuperado e purificado como molde, com o mesmo conjunto de iniciadores e iguais condições de amplificação empregadas na reação anterior. O produto desta reação foi avaliado após a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% seguido de coloração com prata.

Foram também utilizados água ultrapura e o tampão de eluição composto por 50 mM de KCL, 10 mM Tris-HCl pH 7,0, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1% Triton X-100. Depois de adicionados 100 µl desse tampão (ou água) ao fragmento de interesse recortado do gel, o microtubo foi incubado a 65°C durante 10-20 minutos e prosseguiu-se com o protocolo anteriormente descrito.

Alternativamente, tanto com os tampões como com a água, a “sopa” resultante da eluição da banda, formada pelo tampão ou água/DNA eluído (recuperado), foi diretamente empregada na PCR subsequente.

Os produtos de cada uma das reações foram avaliados após a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% seguido de coloração com prata.

Entretanto, a recuperação das bandas de interesse não foi alcançada. Deste modo, alteramos a estratégia proposta inicialmente para a triagem de fragmentos genômicos diferencialmente metilados tumor-específico pela MS-AP-PCR. Nossa nova abordagem inclui a digestão do DNA genômico normal e tumoral, obtido a partir de células microdissecadas a *laser*, pela enzima de restrição *MseI* e *NotI*, e ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos. Subseqüentemente, o *status* de metilação dos dinucleotídeos CpGs de sítios *NotI* serão diferenciados pela ação da enzima de restrição *NotI* previamente à amplificação pela PCR usando a seqüência dos adaptadores ligados aos terminais coesivos criados pela ação da enzima *MseI* como iniciadores. Esta estratégia representa uma adaptação de protocolos previamente descritos por Brock et al. (2001) e Jiang et al. (2000) e encontra-se descrita em detalhes no Anexo VIII.

Os produtos foram clonados utilizando o *InstAclone PCR Cloning Kit* (Fermentas – Life Sciences) para posterior seqüenciamento. As reações de seqüenciamento serão realizadas com o ABI PRISM *Big Dye Terminator Cycle*

Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). As amostras são carregadas em gel desnaturante de poliacrilamida em um seqüenciador automatizado de *DNA ABI 377* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

Inicialmente, cada fragmento seqüenciado será avaliado na ferramenta Phred/Phrap (<http://www.phrap.org>) (Ewing, et al., 1998; Ewing e Green, 1998; Gordon et al., 1998). As seqüências que atingirem os critérios de qualidade (escores acima de 15) serão identificadas pelo uso da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e a caracterização das ilhas CpG na ferramenta *CpG Island Searcher* (<http://www.methdb.de/>) (Takai e Jones, 2003). Serão consideradas ilhas CpG regiões genômicas contendo pelo menos 300pb mostrando um conteúdo de C+G maior do que 55% e onde a freqüência de sítios CpG é a igual ou superior à esperada de 0.65 (Gardiner-Garden e Frommer, 1998). Estas informações serão anotadas e arquivadas em um banco de dados estruturado para cada caso. A anotação global destes dados terá como objetivo a identificação de fragmentos hipermetilados que caracterizam ilhas CpG localizadas na região promotora de genes com função supressora de tumor. Estas seqüências genômicas (biomarcador) serão utilizadas para o delineamento de oligonucleotídios iniciadores para a análise de MSP através da ferramenta *MethPrimer* (<http://www.methdb.de/>) (Li e Dahiya, 2002) para a análise retrospectiva para o estudo do papel do(s) biomarcador(es) selecionado(s) no desenvolvimento do TCC de bexiga.

3.9 Sensibilidade e Especificidade

A análise de MSP aplicada às células obtidas dos lavados vesicais foi comparada aos resultados da análise citológica pareada para se estabelecer a sensibilidade e a especificidade deste teste na predição de recorrência tumoral. Esses parâmetros foram definidos segundo o modelo apresentado por Fletcher et al. (1989): **sensibilidade** é a proporção de indivíduos com a doença que exibem um teste positivo para a mesma, enquanto **especificidade** reflete os sujeitos livres da patologia e que apresentam um teste negativo. Adicionalmente, o *valor preditivo* do teste, positivo ou negativo, consiste na probabilidade da patologia existir num paciente quando o resultado da metodologia é positivo ou negativo, respectivamente.

Testes sensíveis são úteis nos estágios iniciais de um processo diagnóstico, ao passo que testes específicos são de valia para a confirmação de um diagnóstico sugerido por outros dados.



4 Resultados

4.1 Análise Histopatológica dos Fragmentos Tumorais

A análise histopatológica dos fragmentos tumorais demonstrou um padrão de crescimento papilífero em 46 amostras (21 de baixo grau não invasivo, 14 de alto grau não invasivo, um de baixo grau invasivo e 10 de alto grau invasivo), não papilífero em 20 (nove de baixo grau não invasivo, três de alto grau não invasivo e oito de alto grau invasivo) e padrão misto em duas amostras (ambas com os dois graus de diferenciação, sendo uma delas com componentes escamoso e papilífero). Três amostras teciduais coletadas de pacientes submetidos à cirurgia para remoção de TCC não foram representativas dos tumores, pois foram classificadas como cistite crônica, endometriose ou ausência de neoplasia. Adicionalmente, foram identificados três carcinomas espinocelulares e dois adenocarcinomas (um de próstata e outro de endométrio). Juntamente com as amostras tumorais foram coletados pequenos fragmentos de tecido normal (NB) adjacente à lesão, medindo em média 1-2 mm³. Após a reavaliação histopatológica, foi constatada a presença de epitélio normal em 24 amostras; nas demais, esta camada havia sido perdida durante o processo de coleta ou de inclusão em parafina (Anexo IX).

Dependendo da quantidade de tecido coletada, um fragmento foi armazenado em *freezer* a -70°C. Este procedimento foi possível em 57 amostras provenientes de lesões uroteliais e 56 de tecido normal adjacente. Destes últimos, apenas 14 amostras realmente continham epitélio histologicamente normal (NBs 05, 10, 11, 12, 17, 19, 22, 24, 29, 36, 41, 42, 48, 49 e 50). As amostras tumorais e as que continham epitélio normal adjacente ao tumor foram submetidas à extração do DNA genômico e posterior análise de MSP para a determinação dos padrões de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*.

4.2 Avaliação Preliminar *in silico*

Os oligonucleotídeos iniciadores para a análise de MSP na determinação dos padrões de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*, embora tenham sido selecionados de relatos da literatura, tiveram suas seqüências confirmadas pela avaliação *in silico*. Esta avaliação também considerou outras características importantes da região em análise, como a caracterização da ilha CpG e a posição de anelamento dos oligonucleotídeos em relação ao sítio de início da transcrição. Inicialmente, a seqüência da região promotora de cada um dos genes foi identificada em bancos de dados públicos (<http://genome.ucsc.edu>), incluindo 2.000 pb *upstream* ao primeiro éxon. A seqüência selecionada foi submetida a uma simulação da modificação pelo bissulfito de sódio em que todas as citosinas foram substituídas por timinas para a seqüência não metilada e, apenas as citosinas não CpG foram substituídas por timina para a mesma seqüência, considerando-se a presença de metilação. Essas seqüências foram alinhadas contra os respectivos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores na ferramenta BLAST 2 Sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>). Todos os oligonucleotídeos apresentaram 100% de identidade com as seqüências investigadas e delimitaram o tamanho dos *amplicons* para as respectivas reações de MSP.

Subseqüentemente, a submissão das seqüências em estudo à investigação pela ferramenta *Grail Experimental Gene Discovery Suite* (<http://compbio.ornl.gov/Grail-1.3>) (Xu e Uberbacher, 1997), permitiu o mapeamento das seqüências repetidas, incluindo as seqüências *Alu* mascaradas, confirmando que os amplicons não estavam contidos em regiões envolvendo elementos repetitivos. Após a exclusão dos elementos repetitivos, as seqüências-

alvo da região promotora de cada gene foram ainda submetidas à análise tanto na ferramenta *CpG Island Searcher* (<http://www.methdb.de/>) (Takai e Jones, 2002; 2003) quanto na *GpG Island Plot* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>), sendo que ambas as caracterizaram como ilhas CpG (Tabela 3). A Tabela 4 e as Figuras 2-5 apresentam, em detalhes, a posição na ilha CpG dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo em relação ao sítio de início da transcrição e tradução, bem como a distribuição comparativa entre ensaios de análise de metilação relatados em câncer de bexiga para cada um dos genes.

Tabela 3. Caracterização das ilhas CpG dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*

Gene	%CG	ObsCpG/EspCpG	Comprimento (nº nucleotídeos)
<i>CDH1</i>	65,3	0,686	1.735
<i>RARB*</i>	50,6	0,617	1.060
<i>SFN</i>	61,8	0,650	662
<i>RASSF1</i>	64,1	0,741	1.236

Limites inferiores: %CG =55; ObsCpG/EspCpG = 0,65; comprimento = 500; distância = 100; * %CG =50; ObsCpG/EspCpG = 0,60; comprimento = 300; distância = 100

Tabela 4. Distribuição comparativa quanto à posição, na ilha CpG, em relação ao sítio de início da transcrição e tradução, dos oligonucleotídeos iniciadores usados neste estudo e nos ensaios de análise de metilação relatados em câncer de bexiga para os genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*.

Referência	% de Metilação em Bexiga*	Nº Total de CpGs Interrogados	Metodologia Utilizada	Posição dos Sítios CpG Interrogados
<i>CDH1</i>				
Presente estudo (Corn et al., 2001)	-	8	MSP	Sense: -14, 4, 7 Antisense: 68, 73, 78, 82, 88
Bornman et al., 2001	43% (20/47) das neoplasias 33,3% (3/9) epitélio normal-paciente sem tumor	7	MSP	Sense: -58, -53, -46 Antisense: 82, 88, 91, 101
Maruyama et al., 2001	36% (35/98) TCC	3	MSP	Sense: -161, -159 Antisense: -84
Chung et al., 2001	0/5 linhagens celulares derivadas de tumores de bexiga (incluindo T24 e 5637)	3	MSP	Sense: -161, -159 Antisense: -84
Chan et al., 2002	63,3% (62/98) TCC 50% (2/4) CIS 0/7 epitélio normal-paciente sem tumor 59,1% (13/22) sedimento urinário pareado 0/17 sedimento urinário-paciente sem tumor	3	MSP	Sense: -161, -159 Antisense: -84
Ribeira-Filho et al., 2002	84% (43/51) TCC 24% (12/51) NB 100% (2/2) linhagens celulares (incluindo T24)	3	MSP	Sense: -161, -159 Antisense: -84
Horikawa et al., 2003	47% (23/49) TCC	4	MSP	Sense: -58 Antisense: 105, 108, 114

Gutierrez et al., 2004	26% (8/31) SCC	7	MSP	Sense: -58 Antisense: -53, -46, 82, 88, 91, 101
Catto et al., 2005	60% (61/101) TCC 79% (120/152) TCC de UTT	3	MSP e Seqüenciamento	Sense: -161, -159 Antisense: -84
Friedrich et al., 2005	9,5% (10/105) TCC 34,2% (13/38) NB	4	<i>MethyLight</i> com modificações	Sense: -161, -159, -151 Antisense: -84
Dhawan et al., 2006	82,7% (62/75) TCC 64,1% (41/61) CIS 47,4% (27/57) NB 33,3% (5/15) epitélio normal-paciente sem tumor 66,6% (2/3) linhagens celulares (derivadas de tumores superficial e avançado)	-	QMSP	-
Hoque et al., 2006	87% (13/15) Tu1 77% (10/13) urina de paciente com Tu1 hipermetilado	4	<i>MethyLight</i>	Sense: -161, -159 Antisense: -132, -123
<i>RARB</i>				
Presente estudo (Evron et al., 2001)	-	7	MSP	Sense: 111, 113, 117, 122 Antisense: 231, 236, 249
Maruyama et al., 2001	15% (15/98) TCC	8	MSP	Sense: 105, 111, 113, 117, 122 Antisense: 231, 236, 249
Chan et al., 2002	87,8% (86/98) TCC 50% (2/4) CIS 42,9% (3/7) epitélio normal-paciente sem tumor 68,2% (15/22) sedimento urinário pareado 23,5% (4/17) sedimento urinário-paciente sem tumor	5	MSP	Sense: -61, -47 Antisense: 144, 147, 159

Gutierrez et al., 2004	30% (9/31) SCC	8	MSP	Sense: 105, 111, 113, 117, 122 Antisense: 231, 236, 249
Catto et al., 2005	24% (23/94) TCC 37% (59/159) TCC de UTT	8	MSP e Seqüenciamento	Sense: 105, 111, 113, 117, 122 Antisense: 231, 236, 249
Dhawan et al., 2006	16% (12/75) TCC 9,4% (6/64) CIS 0/57 NB 0/15 epitélio normal-paciente sem tumor 66,6% (2/3) linhagens celulares (derivadas de tumores pré-invasivo e avançado)	-	QMSP	-
Hoque et al., 2006	93% (14/15) Tu1 64% (9/14) urina de paciente com Tu1 hipermetilado	3	MethyLight	Sense: 81 Antisense: 144, 147
Neuhausen et al., 2006**	19% (18/96) carcinoma urotelial hipermetilação em linhagens celulares derivadas de carcinoma urotelial	-	MSP	-
SFN				
Presente estudo (Ferguson et al., 2000)	-	4	MSP	Sense: 153, 156 Antisense: 219, 228
Kunze et al., 2006	57,1% (8/14) TCC NPAGI 28,6% (4/14) TCC PBGNI 80% (12/15) SCC invasivo 25% (3/12) USCC invasivo	4	MSP	Sense: 153, 156 Antisense: 219, 228
RASSF1				
Presente estudo (Burbee et al., 2001)	-	7	MSP	Sense: -66, -60, -58 Antisense: 77, 82, 84, 94

Lee et al., 2001	62% (34/55) Tu1 0/15 NB 80% (4/5) linhagens celulares, incluindo T24	"15"	MSP e Seqüenciamento	-
Maruyama et al., 2001	35% (34/98) TCC	7	MSP	Sense: -66, -60, -58 Antisense: 77, 82, 84, 94
Chan et al., 2003	47,5% (19/40) TCC 0/6 CIS 0/6 epitélio normal-paciente sem tumor 50% (7/14) sedimento urinário pareado 66,6% (2/3) linhagens celulares, incluindo T24	7	MSP	Sense: 219, 221, 226, 231 Antisense: 286, 297, 299
Dulaimi et al., 2004	51% (23/45) tumores 87% (39/45) sedimento urinário pareado 0/12 sedimento urinário-paciente sem tumor 0/9 sedimento urinário-paciente com cistite 0/5 epitélio normal de uretra-paciente com carcinoma renal	"16"	MSP	Inclui os sítios de início da transcrição e tradução
Fried rich et al., 2004	60% (76/127) tumores 42% (16/37) NB maioria das amostras de sedimento urinário de pacientes sem neoplasia e das linhagens celulares (7 foram avaliadas, incluindo T24)	4	<i>MethyLight</i> com modificações	Sense: 160 Antisense: 196, 202, 211
Gutierrez et al., 2004	26% (8/31) SCC	5	MSP	Sense: 16, 19 Antisense: 107, 114, 124
Catto et al., 2005	54% (57/106) TCC 63% (100/159) TCC de UTT	7	MSP e Seqüenciamento	Sense: -66, -60, -58 Antisense: 77, 82, 84, 94

Friedrich et al., 2005	59% (62/105) TCC 42,1% (16/38) NB	4	<i>MethyLight</i> com modificações	Sense: 160 Antisense: 196, 202, 211
Dhawan et al., 2006	57,3% (43/75) TCC 59,4% (38/64) CIS 38,6% (22/57) NB 13,3% (2/15) epitélio normal-paciente sem tumor 100% (3/3) linhagens celulares (derivadas de tumores superficial, pré-invasivo e avançado)		QMSP	
Hoque et al., 2006	67% (10/15) Tu1 80% (8/10) sedimentos urinários de paciente com Tu1 hipermetilado	6	MethyLight	Sense: 44, 53, 60 Antisense: 94, 107, 114
Marsit et al., 2006	32,2% (113/351) tumores = 98,2% (111/113) TCC e 1,8% (2/113) não TCC	6	MSP	Sense: 60, 73, 77 Antisense: 114, 124, 130
Neuhausen et al., 2006**	35% (34/96) carcinoma urotelial hipermetilação em linhagens celulares derivadas de carcinoma urotelial	-	MSP	-
Yates et al., 2006**	Freqüências mais altas no sedimento urinário de pacientes com TCC em relação àqueles sem TCC, tanto jovens quanto idosos	-	MethyLight	-

* tecidos/linhagens celulares relacionadas e sedimento urinário estão inclusos em alguns casos; ** não possível o acesso ao artigo completo; NB = tecido normal adjacente ao tumor; CIS = carcinoma *in situ*; SCC = carcinoma de células escamosas; UTT = tumores do trato superior; Tu1 = tumor primário; NPAGI = não papilífero de alto grau invasivo; PBGNI = papilífero de baixo grau não invasivo; USCC = carcinoma indiferenciado de pequenas células; MSP = *Methylation-Specific PCR*; QMSP = *real time, Semiquantified Methylation-Specific PCR*.

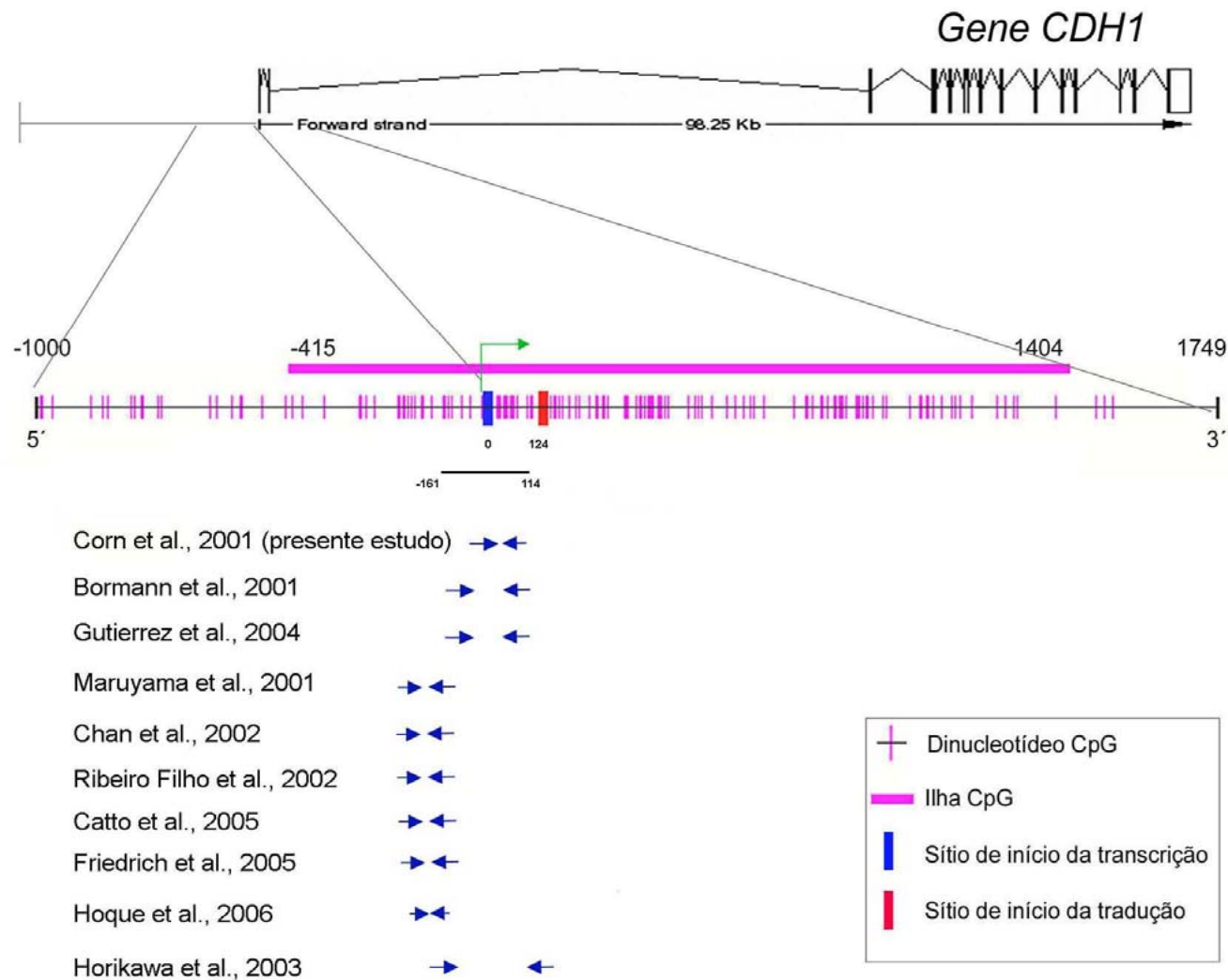


Figura 2. Detecção da hipermetilação do gene *CDH1* em câncer de bexiga através de ensaios baseados no tratamento do DNA com bissulfato de sódio. Na porção superior, está representado o gene *CDH1* e, logo abaixo, sua região regulatória é mostrada desde as posições -1000 até +1749 em relação ao sítio de início transcritorial (representado pela barra azul/seta verde). O sítio de início da tradução está representado pela barra vermelha. As barras verticais em rosa indicam os dinucleotídeos CpG. A barra horizontal rosa, compreendendo desde a posição -415 até +1404, representa a ilha CpG encontrada para o gene *CDH1*. As setas aos pares na cor preta, em destaque na porção inferior da figura, indicam as posições de anelamento dos *primers* para MS-PCR/MethylLight observadas nos estudos apresentados na Tabela 4.

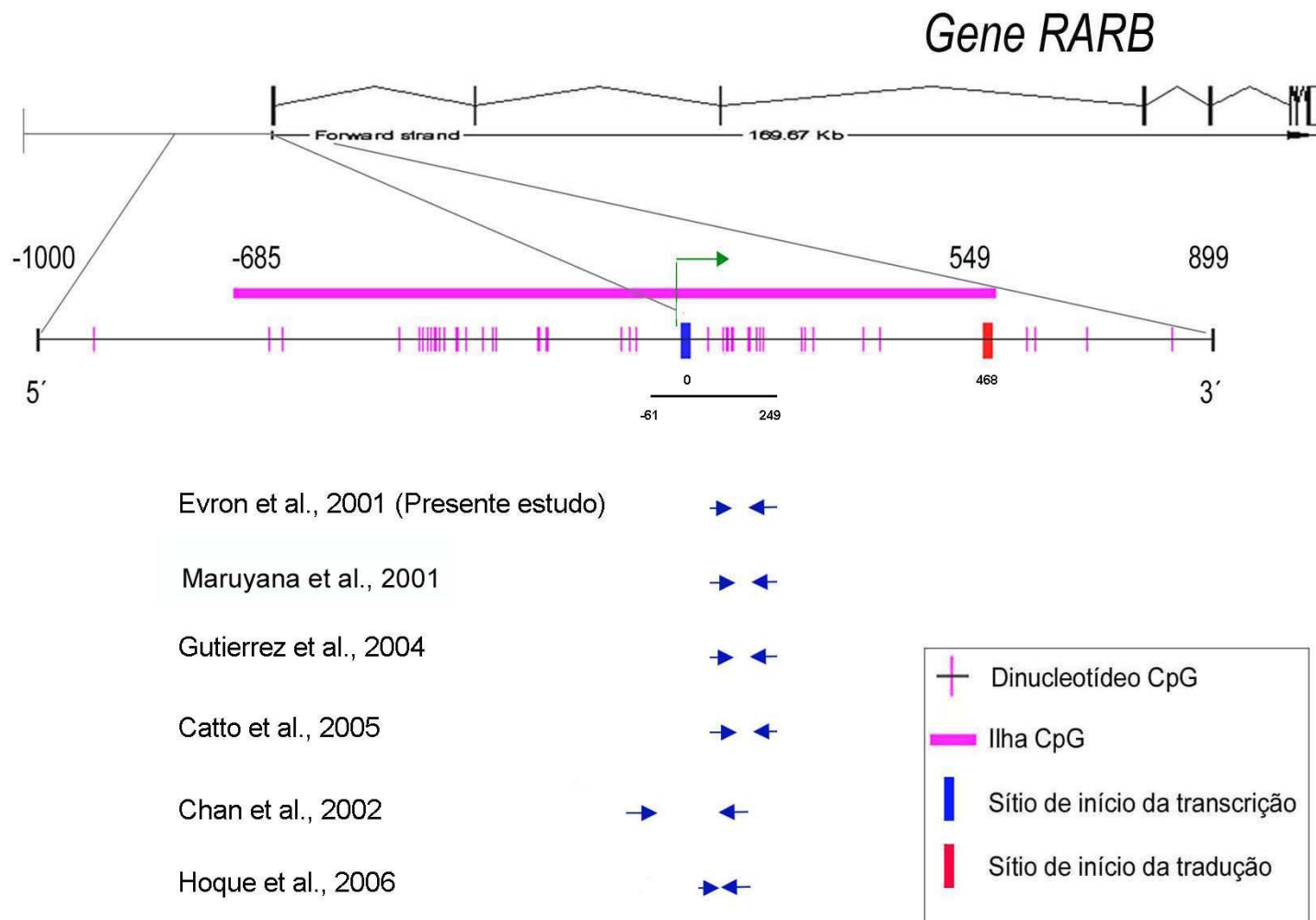


Figura 3. Detecção da hipermetilação do gene *RARB* em câncer de bexiga através de ensaios baseados no tratamento do DNA com bissulfito de sódio. Na porção superior, está representado o gene *RARB* e, logo abaixo, sua região regulatória é mostrada desde as posições -1000 até +899 em relação ao sítio de início transcricional (representado pela barra azul/seta verde). O sítio de início da tradução está representado pela barra vermelha. As barras verticais em rosa indicam os dinucleotídeos CpG. A barra horizontal rosa, compreendendo desde a posição -685 até +549, representa a ilha CpG encontrada para o gene *RARB*. As setas aos pares na cor preta, em destaque na porção inferior da figura, indicam as posições de anelamento dos *primers* para MS-PCR/MethyLight observadas nos estudos apresentados na Tabela 4.

Gene SFN

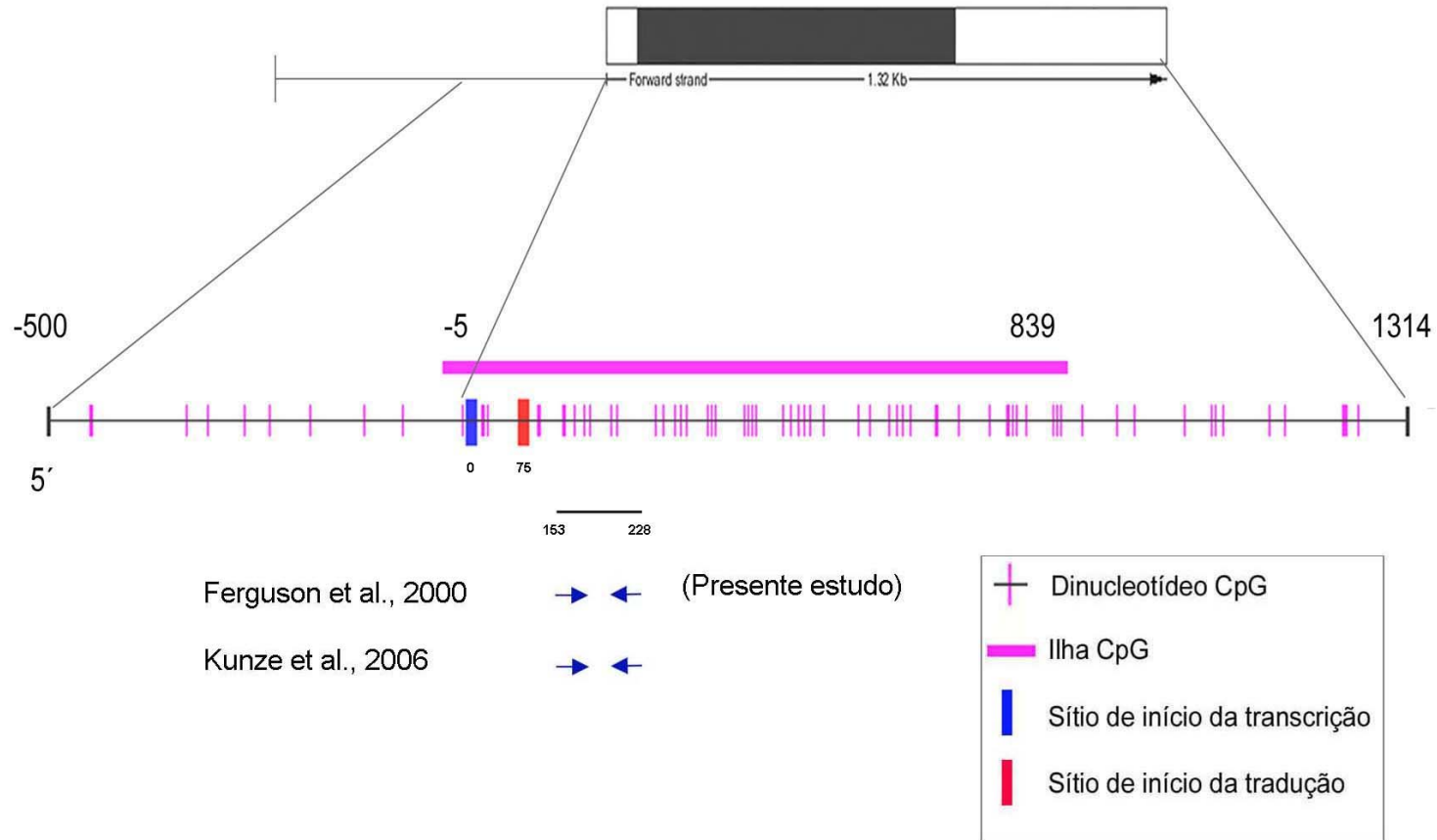


Figura 4. Detecção da hipermetilação do gene *SFN* em câncer de bexiga através de ensaios baseados no tratamento do DNA com bissulfato de sódio. Na porção superior, está representado o gene *SFN* e, logo abaixo, sua região regulatória é mostrada desde as posições -500 até +1314 em relação ao sítio de início transcricional (representado pela barra azul/seta verde). O sítio de início da tradução está representado pela barra vermelha. As barras verticais em rosa indicam os dinucleotídeos CpG. A barra horizontal rosa, compreendendo desde a posição -5 até +839, representa a ilha CpG encontrada para o gene *SFN*. As setas aos pares na cor preta, em destaque na porção inferior da figura, indicam as posições de anelamento dos *primers* para MS-PCR observadas nos estudos apresentados na Tabela 4.

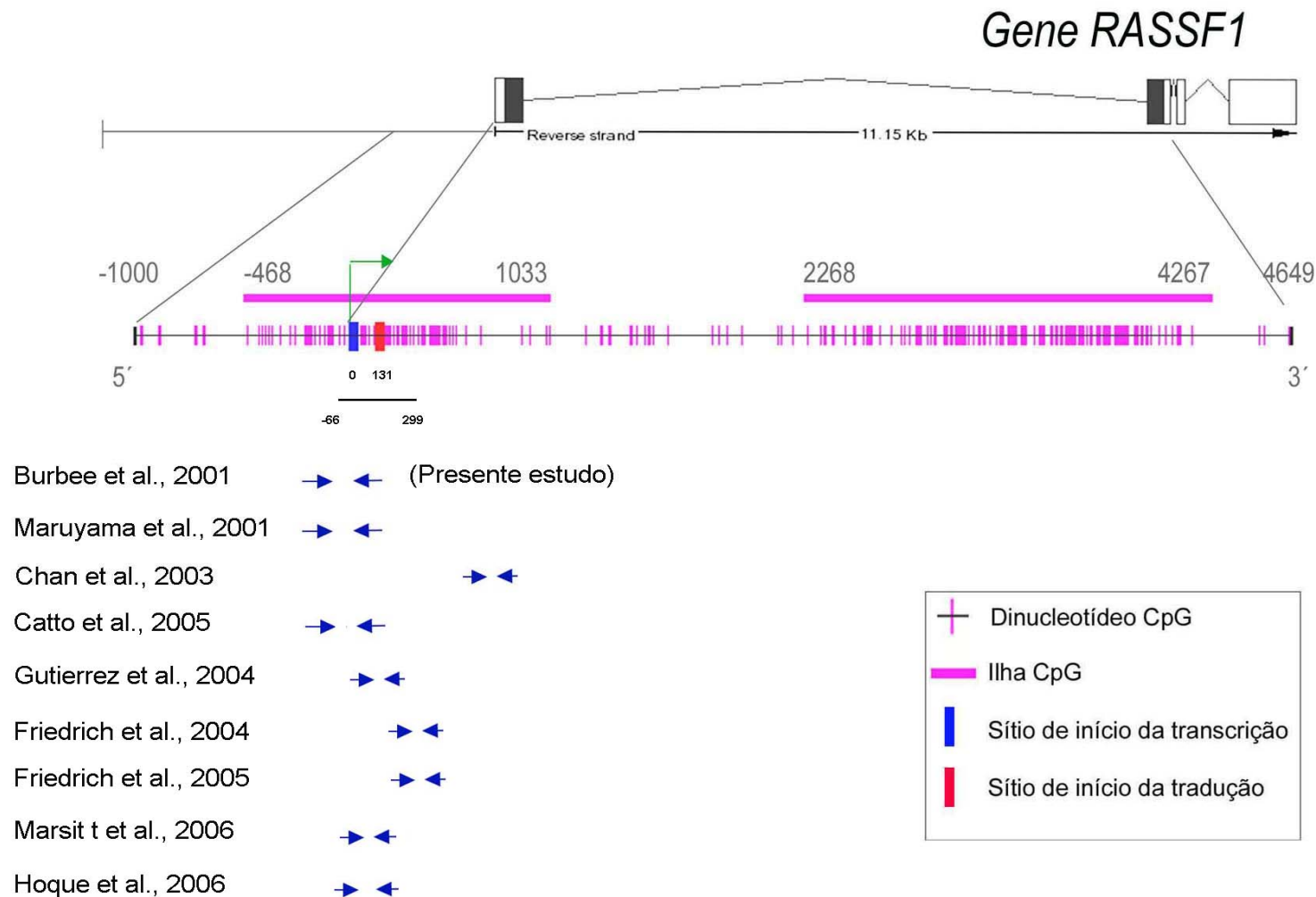


Figura 5. Detecção da hipermetilação do gene *RASSF1* em câncer de bexiga através de ensaios baseados no tratamento do DNA com bissulfato de sódio. Na porção superior, está representado o gene *RASSF1* e, logo abaixo, sua região regulatória é mostrada desde as posições -1000 até +4649 em relação ao sítio de início transcripcional (representado pela barra azul/seta verde). O sítio de início da tradução está representado pela barra vermelha. As barras verticais em rosa indicam os dinucleotídeos CpG. As barras horizontais em rosa, compreendendo desde a posição -468 até +1033 e -2268 até +4267, representam as ilhas CpG encontradas para o gene *RASSF1*. As setas aos pares na cor preta, em destaque na porção inferior da figura, indicam as posições de anelamento dos *primers* para MS-PCR/MethylLight observadas nos estudos apresentados na Tabela 4.

4.3 MSP: Genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1*

Os padrões de metilação foram determinados em 54 amostras de tecidos tumorais de bexiga (32 TCC papilíferos, 16 TCC não papilíferos, um TCC papilífero com componente escamoso, três carcinomas espinocelulares e dois adenocarcinomas) e em três amostras classificadas como endometriose, cistite crônica e ausência de neoplasia. Em 14 amostras de TCC também foi possível a análise do epitélio normal adjacente ao tumor (Tabela 5). A análise de MSP mostrou que 100% dos tecidos tumorais, independente do tipo histológico, apresentaram-se hipermetilados para os genes *CDH1* e *SFN*. Altas frequências de hipermetilação foram também observadas para o gene *RARB*. A ausência de metilação do gene *RARB* foi detectada em apenas 3/15 TCCs papilíferos de baixo grau não invasivo, 1/6 TCCs papilíferos de alto grau não invasivo, no TCC papilífero de baixo grau invasivo, em 1/10 TCC papilífero de alto grau invasivo, em 1/5 TCC de baixo grau não invasivo, em 1/3 TCC de alto grau invasivo, no TCC papilífero com componente escamoso e em 1/3 carcinoma espinocelular.

Nos 14 casos apresentando amostras pareadas de tecido normal e tumoral, observou-se um padrão concordante para o gene *CDH1*. Para o gene *SFN*, apenas um par (caso 050) mostrou discordância com a presença de metilação restrita ao tecido tumoral. De maneira semelhante ao observado para os genes *CDH1* e *SFN*, a hipermetilação do gene *RARB* estava presente em ambos os tecidos na maioria dos casos; dois casos mostraram padrão discordante, a hipermetilação restrita ao tecido normal (casos 012 e 042). Para o gene *RASSF1*, a hipermetilação foi detectada em 3/15 TCCs papilíferos de baixo grau não invasivo, 1/6 TCC papilífero de alto grau não invasivo, 3/10 TCCs papilífero de alto grau invasivo, 0/5 TCC baixo grau não invasivo, 2/3 TCCs alto grau não invasivo, 2/8

TCCs de alto grau invasivo, em 1/3 carcinoma espinocelular e nos dois adenocarcinomas. Nas 14 amostras pareadas de tecido normal e tumoral, observou-se padrões discrepantes em quatro amostras (casos 010, 022, 029 e 036) que apresentavam a hipermetilação restrita ao tumor; nove amostras estavam não metiladas em ambos os tecidos e apenas um par mostrou-se hipermetilado (caso 011) (Figura 6) (Tabela 5). Entretanto, antes que fosse realizada a reavaliação histopatológica, todas as amostras coletadas a fresco tiveram os seus tecidos normais adjacentes ao tumor avaliados pela metodologia de MSP; estes resultados encontram-se descritos no Anexo X.

Tabela 5. Padrões de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* em amostras normais e em lesões vesicais.

Amostra	<i>CDH1</i>		<i>RARB</i>		<i>SFN</i>		<i>RASSF1</i>		Recorrências (tempo em meses desde o tumor primário)	Acompanhamentos (tempo em meses desde o tumor primário)	Seguimento (até 11/2006)	<i>Follow-up*</i> (mês/ano)
	U	M	U	M	U	M	U	M				
TCC papilífero de baixo grau não invasivo												
010	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	29	Vivo sem recorrência (01/05)
NB 010	+	+	+	+	+	+	+	-				
011	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (14m)	(4m)	44	Vivo sem recorrência (11/04)
NB 011	+	+	+	+	+	+	+	+				
012	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (20m)	0	30	Vivo sem recorrência
NB 012	+	+	+	+	+	+	+	-				
017	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (22m)	(9m)	38	Vivo sem recorrência
NB 017	+	+	+	+	+	+	+	-				
020	+	+	+	-	+	+	+	-	0	0	29	Perdido para seguimento
021	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (29m)	0	58	Vivo sem recorrência
024	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	06 morte	Óbito por outras causas
NB 024	+	+	+	+	+	+	+	-				
027	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(4m); (7m); (10m)	19 morte	Óbito por outras causas
028	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (20m)	0	48	Vivo sem recorrência
031	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(4m); (8m); (11m)	35	Vivo sem recorrência
033	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (28m)	0	55	Vivo sem recorrência
041	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(3m)	27	Vivo sem recorrência
NB 041	+	+	-	+	+	+	+	-				
042	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (36m); 2 (88m)	0	115	Vivo sem recorrência
NB 042	+	+	+	+	+	+	+	-				
059	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (35m) (40m)	(3m); (7m)	77	Vivo sem recorrência
061	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (18m)	0	49	Vivo sem recorrência

TCC papilífero de alto grau não invasivo

008	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	28	Perdido para seguimento
032	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (16m)	(3m)	57 morte	Óbito por outras causas
037	+	+	+	+	+	+	+	-	nd	0	27	Perdido para seguimento
50	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (31m-lesão pap séssil)	0	39	Vivo com a doença
NB 050	+	+	+	+	+	-	+	-				
022	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	06 morte	Óbito por outras causas
NB 022	+	+	+	+	+	+	+	-				
058	+	+	+	-	+	+	+	-	0	0	26	Vivo sem recorrência (05/05)

TCC papilífero de baixo grau invasivo

018	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (17m)	0	29	Vivo sem recorrência
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---------	---	----	----------------------

TCC papilífero de alto grau invasivo

005	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	30	Vivo sem recorrência
NB 005	+	+	+	+	+	+	+	-				
007	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0	41 morte	Óbito por outras causas (11/04)
015	+		+		+		+		1 (14m)	(4m)	18	Vivo com recorrência (07/06) TCC III ulcerado invasão de corion
		+		-		+		-				
029	+		+		+		-	+	0	0	19	Vivo sem recorrência (após cistectomia radical 04/06)
NB 029	+	+	+	+	+	+	+	-				
046	+	+	+	+	+	+	+	-		0		
023	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(4m)	33	Perdido para seguimento
026	+	+	+	+	+	+	-	-	0	(3m)	04 morte	Perdido para seguimento
030	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	28	Perdido para seguimento
036	+	+	+	+	+	+	+	+	0	(2m); (14m)	14 morte	Óbito por outras causas (08/04)
NB 036	+	+	+	+	+	+	+	-				

069	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	24	Vivo sem recorrência	
TCC baixo grau não invasivo													
001	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(5m)	98	Vivo sem recorrência
014	+	+	+	-	+	+	+	+	-	0	0	07 morte	Óbito por outras causas
035	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(2m); (7m)		Perdido para seguimento
055	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (20m)	0	46	Vivo sem recorrência
071	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (7m)	0	55	Vivo sem recorrência (03/05)
TCC alto grau não invasivo													
049	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	26	Vivo sem recorrência
NB 049	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
003	+	+	+	-	+	+	+	+	+	0	0	30	Perdido para seguimento
006	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (36m)	0	30	Perdido para seguimento
TCC alto grau invasivo													
002	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (9m)	0	38	Vivo sem recorrência
004	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (64m); (67m)	0	96	Vivo sem recorrência
016	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (7m)	0	18 morte	Óbito por outras causas (05/04)
019	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (8m)	0	09 morte	Óbito por outras causas (03/05)
NB 019	+	+	+	+	+	+	+	+	-				
040	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	nd	Perdido para seguimento
065	+		+		+		+		-	1 (5m)	0	24	Vivo com a doença, em radioterapia na pelve (09/06)
068	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	26	Perdido para seguimento
074	+		+		+		+		+	1 (17m); 2 (49m)	0	73	Vivo com a doença - lesão papilífera em trígono
TCC papilífero de baixo e alto grau com componente escamoso													
NB 048	+	+	+	-	+	+	+	+	-	0	0	26	Vivo sem recorrência (11/05)
064	+	+	+	-	+	+	+	+	-	1 (10m)	(3m)	27	Vivo

Outros**Carcinoma espinocelular**

009	+	+	+	-	+	+	+	+	0	0	02 morte	Óbito por outras causas (08/04)
060	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(2m)	04 morte	Óbito por outras causas (02/05)
076	+		+		+		+		1 (8m) (10m)	(2m)	12 morte	Óbito por câncer de bexiga com metástase e hidroeletrólítico (09/05)

Adenocarcinoma

057	+		+		+		+		0	0	26	Vivo após cistectomia radical pós quimioterapia
072	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (12m)	0	37	Perdido para seguimento

Endometriose

025	+	+	+	-	+	+	+	+	0	0	28	Perdido para seguimento
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-------------------------

Cistite crônica

038	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	28	Vivo sem recorrência
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------------------

Ausência de neoplasia

013	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (6m) (10m) (24m)	0	40	Vivo com a doença (09/06)
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	--------------------	---	----	---------------------------

M = alelos metilados; U = alelos não metilados; m = meses; * variável segundo informações de prontuário

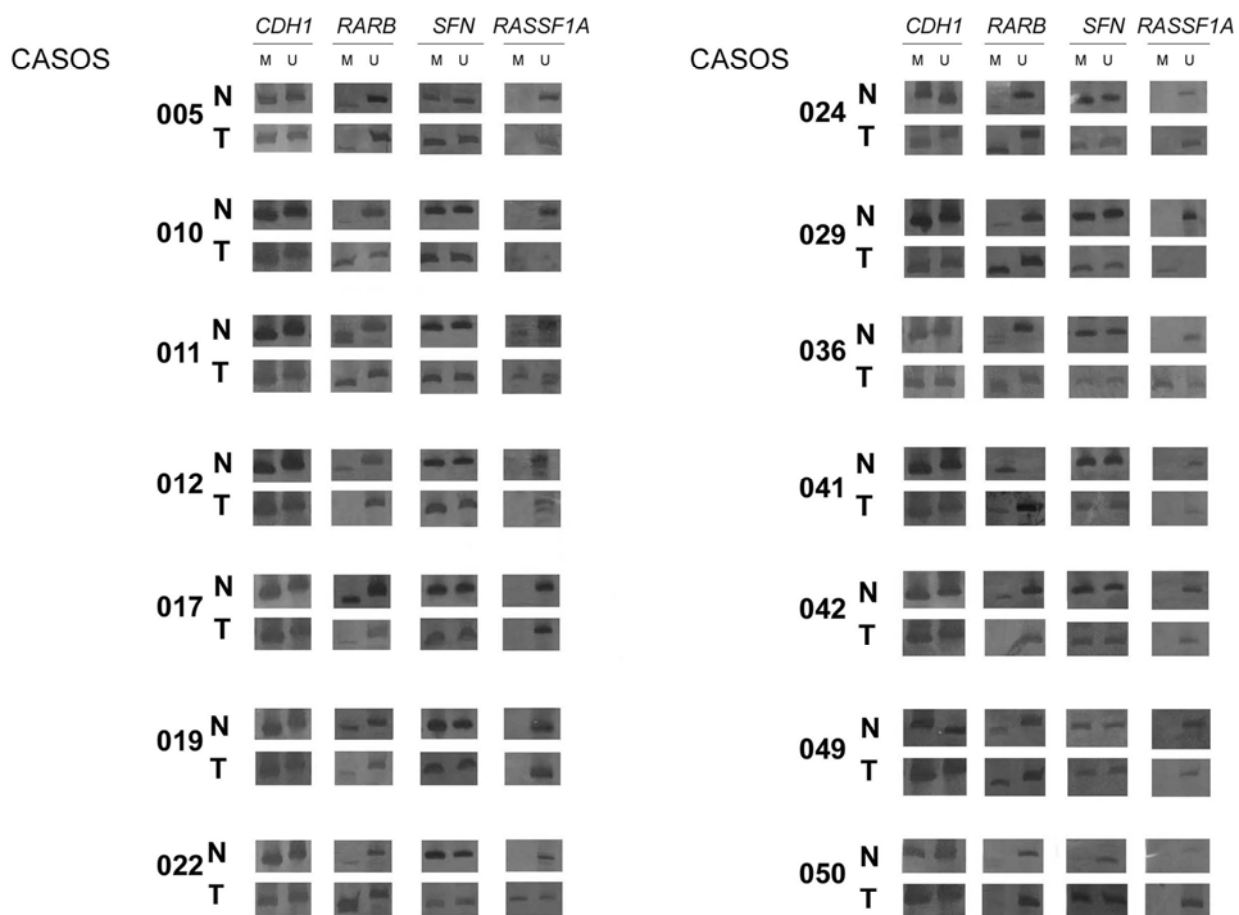


Figura 6. Padrão de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* após análise de MSP realizada a partir de DNA genômico obtido de tecidos uroteliais normais e tumorais extraídos de amostras a fresco; gel de poli-acrilamida 6% corado com nitrato de prata. N = normal; T = tumoral; M = alelos metilados; U = alelos não metilados.

Entre os 49 pacientes portadores de TCC, a idade variou entre 40 a 88 anos (média de $67,31 \pm 10,58$ anos). A distribuição entre os sexos revelou uma razão de 4,44 indivíduos de sexo masculino para cada mulher afetada pela doença. A presença ou ausência de metilação nos genes *RARB* e *RASSF1* foram comparadas com parâmetros demográficos e clínicos (idade, sexo e recorrência tumoral) e histopatológicos (padrão de crescimento, grau de diferenciação e invasão) em 48 TCCs (Tabela 6). O caso TCC 064 não foi incluído nesta análise, pois apresentava, além do padrão papilífero de baixo e alto grau, áreas com componente escamoso; este caso mostrou a ausência de metilação para os dois genes. A hipermetilação foi correlacionada com tumores de indivíduos do sexo masculino. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a hipermetilação do gene *RARB* ($P = 0,0499$, Teste exato de Fisher) e uma tendência para o gene *RASSF1* ($P = 0,0946$, Teste exato de Fisher). Para os demais parâmetros, não foram detectadas associações significativas.

Tabela 6. Frequência dos parâmetros demográficos, clínicos, histopatológicos e dos padrões de metilação do DNA entre as 48* amostras de TCCs classificadas segundo o padrão de metilação observado para os genes *RARB* e *RASSF1*.

Variável	<i>RARB</i>		<i>P</i>	<i>RASSF1</i>		<i>P</i>
	U	M		U	M	
Idade**						
≤ 60 anos	1	8	0,6666	6	3	0,4188
> 60 anos	8	30		30	8	
Sexo						
Feminino	4	5	0,0499 ^a	9	0	0,0946 ^b
Masculino	5	34		28	11	
Padrão de crescimento						
Papilífero	7	25	0,6974	25	7	1,0000
Não papilífero	2	14		12	4	
Grau de diferenciação						
Baixo	5	16	0,4772	18	3	0,3043
Alto	4	23		19	8	
Invasão						
Presença	2	17	0,2864	14	5	0,7323
Ausência	7	22		23	6	
Recorrência*						
Presença	5	17	0,7148	18	4	0,5046
Ausência	4	21		18	7	

* a amostra com TCC misto foi excluída desta análise; ** 47 casos; M = alelos metilados; U = alelos não metilados; a = estatisticamente significativo em nível de 5% e b = considerado como uma tendência à diferença significativa; Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$).

O padrão de metilação dos quatro genes também foi determinado nas linhagens 5637 e T24, ambas classificadas como de alto grau, porém derivadas de tumores não invasivo e invasivo, respectivamente. Os genes *CDH1* e *RASSF1* estavam hipermetilados nas duas linhagens e o gene *RARB* estava não metilado. Na avaliação do gene *SFN*, a hipermetilação foi observada na linhagem 5637, mas não na linhagem T24 (Figura 7). Esses padrões foram constantes e independentes das condições de cultivo. Na Figura 8 pode ser observado o padrão de crescimento de cada uma das linhagens.

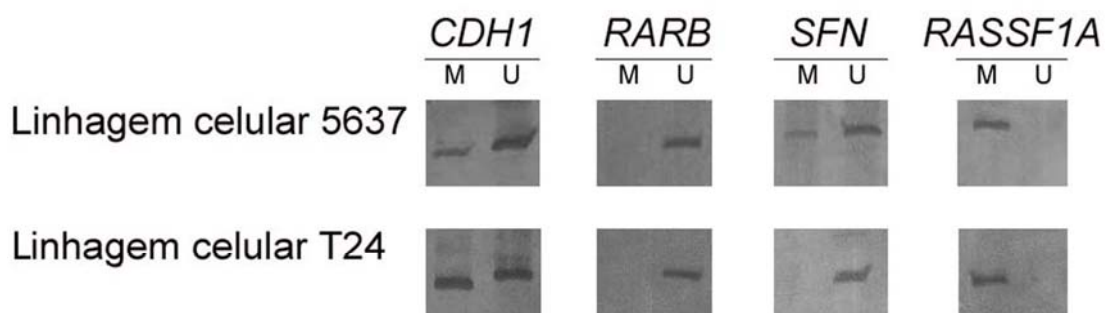


Figura 7. Padrão de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* nas linhagens celulares derivadas de carcinomas uroteliais. M = alelos metilados, U = alelos não metilados.

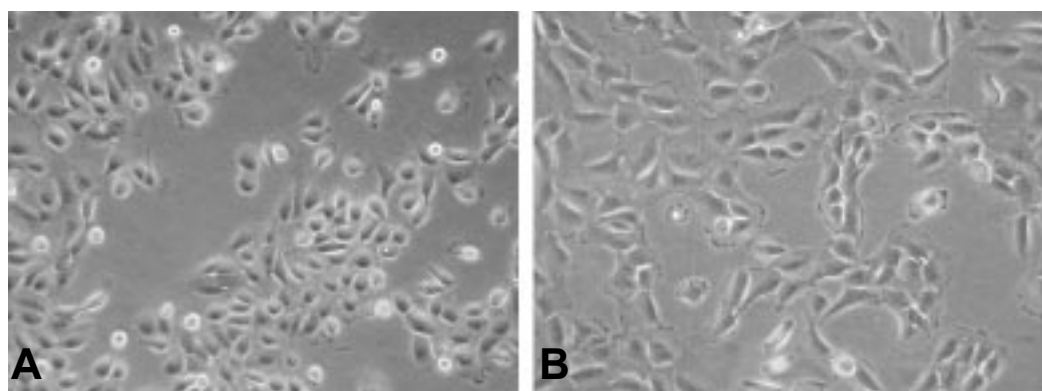


Figura 8. Padrão de crescimento das linhagens 5637 (A) e T24 (B). Imagem obtida em microscópio de contraste de fase. Aumento de 400X.

Com o objetivo de avaliar a capacidade da metodologia de MSP na predição da presença de células tumorais obtidas a partir de lavados vesicais de pacientes submetidos à avaliação citoscópica devido a suspeita clínica de carcinoma urotelial ou acompanhamento pós-cirúrgico para a detecção de recorrência tumoral, foram coletadas 52 amostras de lavados vesicais junto ao Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Deste conjunto, 25 amostras foram provenientes de pacientes sem história de tumores uroteliais e com resultado negativo para presença de células neoplásicas ao exame citológico. Das 27 amostras de pacientes com história de neoplasia vesical, oito apresentaram citologia positiva indicativa de recorrência tumoral. A Tabela 7 apresenta os dados de MSP para os quatro genes em todas as amostras analisadas. Na Tabela 8, os dados foram agrupados em três subconjuntos: para pacientes com história de TCC e citologia positiva para neoplasia, pacientes com história de TCC e citologia negativa, e pacientes sem tumores vesicais prévios e citologia negativa. As maiores frequências de hipermetilação foram observadas para os genes *CDH1* e *SFN*, e variaram entre 62,5% a 100%. Frequências menores, variando entre 8% a 54% foram observadas para os genes *RARB* e *RASSF1*, respectivamente.

Tabela 7. Análise de MSP em amostras de sedimento de lavados vesicais obtidas de pacientes com e sem história de neoplasia urotelial.

Amostra	Idade	Sexo	Diagnóstico do TCC primário	Número de Recorrência(s)	Citologia	Hipermetilação			
						CDH1	RARB	SFN	RASSF1
Pacientes com história de neoplasia de bexiga									
LV 013	48	F	PBGNI	0	+				
LV 037	62	M	PBGNI	0	+				
LV 030	57	M	PBGNI	0	+				
LV 012	82	M	PBGI	0	+				
LV 019	74	M	PBGNI	2	+				
LV 029	57	M	BGNI	2	+				
LV 033	84	M	BGNI	5	+				
LV 051	75	M	AGNI	0	+				
LV 024	65	M	PBGNI	1	-				
LV 043	78	M	PBGNI	0	-				
LV 046	82	F	PBGNI	0	-				
LV 048	47	M	PBGNI	0	-				
LV 007	80	M	PBGNI	1	-				
LV 044	81				-				
LV 008	72	M	PBGNI	1	-				
LV 015	42	M	PBGNI	0	-				
LV 021	72	M	PBGNI	3	-				
LV 034	57	M	PBGNI	1	-				
LV 052	58				-				
LV 040	79	F	PBGNI	4	-				
LV 005	78	M	PAGNI	0	-				
LV 017	57	M	PAGNI	1	-				
LV 011	82	M	PAGNI	1	-				
LV 010	74	M	AGNI	1	-				
LV 035	74				-				
LV 038	80	M	PAGNI	0	-				
LV 049	68	M	AGI	0	-				
Pacientes sem história de neoplasia									
Cistite									
LV 004	65	F	-	-	-				
LV 014	26	M	-	-	-				
LV 016	42	F	-	-	-				
LV 026	82	M	-	-	-				

Ausência de neoplasia

LV 006	65	M	-	-	-				
LV 009	64	M	-	-	-				
LV 028	51	M	-	-	-				
LV 031	77	M	-	-	-				
LV 032	54	F	-	-	-				
LV 039	77	M	-	-	-				
LV 042	59	M	-	-	-				
LV 045	59	F	-	-	-				
LV 001	52	M	-	-	-				
LV 023	68	M	-	-	-				
LV 036	58	F	-	-	-				
LV 002	70	F	-	-	-				
LV 003	57	F	-	-	-				
LV 018	58	F	-	-	-				
LV 020	56	M	-	-	-				
LV 022	44	F	-	-	-				
LV 027	44	M	-	-	-				
LV 025	nd	nd	-	-	-				
LV 041	nd	nd	-	-	-				
LV 047	nd	nd	-	-	-				
LV 050	nd	nd	-	-	-				

PBGNI = tumor papilífero de baixo grau, não invasivo; PBGI = tumor papilífero de baixo grau, invasivo; PAGNI = tumor papilífero de alto grau, não invasivo; BGNI = tumor de baixo grau, não invasivo; AGNI = tumor de alto grau, não invasivo; AGI = tumor de alto grau invasivo; nd = não determinado

	Presença de hipermetilação
	Ausência de hipermetilação
	Não determinado

Tabela 8. Frequência dos resultados de MSP para os genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* em amostras de lavados vesicais submetidas à avaliação citológica para pesquisa de células neoplásicas.

Grupo	Exame Citoscópico	Nº de Indivíduos	Hipermetilação/Nº de casos analisados (%)			
			<i>CDH1</i>	<i>RARB</i>	<i>SFN</i>	<i>RASSF1</i>
Com TCC	P	8	8/8 (100)	1/8 (12,5)	5/8 (62,5)	0/6 (0)
	N	19	16/18 (88,9)	2/18 (11,1)	16/17 (94,1)	7/13 (53,8)
Sem TCC	N	25	21/23 (91,3)	2/24 (8,3)	21/22 (95,4)	8/18 (50)

P = positivo para neoplasia; N = negativo para neoplasia.

Foi observada a ausência de metilação para o gene *RASSF1* em todas as amostras de lavados do grupo de pacientes com história de TCC e citologia positiva (Tabela 7). A análise comparativa entre esses dados de MSP no DNA obtido dos lavados vesicais e os respectivos tumores primários e/ou recorrências mostrou que o gene *RASSF1* foi metilado em quatro amostras de tecidos incluídos em parafina provenientes de seis destes oito pacientes. A Tabela 9 mostra os resultados de hipermetilação dos genes *RARB* e *RASSF1* para 23 amostras de lavados vesicais obtidas de 20 pacientes, e 39 amostras pareadas de tecidos tumorais incluídas em parafina (TCCs primários e/ou recorrências). A hipermetilação para pelo menos um destes genes foi observada em amostras tumorais obtidas de 13 pacientes. O gene *RARB* foi hipermetilado em fragmentos de tecidos tumorais nos pacientes 01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 11, 13, 14, 16 e 20, dos quais cinco apresentaram citologia positiva (casos 01, 02, 07, 08 e 09). O gene *RASSF1* estava hipermetilado nos tecidos dos pacientes 02, 05, 06, 07, 08, 19 e 20, porém não foi possível a sua análise nos casos 01, 09, 10, 11, 13, 15, 16, 17 e 18. Neste subgrupo, quatro casos apresentaram citologia positiva (casos 02, 07, 08 e

19). Entre as amostras de DNA obtidas dos lavados positivos para a presença de neoplasia, somente o caso 08 mostrou a hipermetilação do gene *RARB* no DNA das células do lavado (para o gene *RASSF1* esta análise não foi possível nos casos 01 e 02).

Os casos 11 e 20 apresentaram citologia negativa e ausência de metilação nas células do lavado vesical, porém o tumor primário estava hipermetilado para pelo menos um dos dois genes. Cinco casos (03, 05, 06, 13 e 15) mostraram citologia negativa e presença de metilação para o gene *RASSF1* nas células do mesmo lavado. A hipermetilação deste gene foi confirmada no tumor nos casos 05 e 06.

Além disso, considerando o gene *RARB*, no subgrupo de cinco pares positivos para a hipermetilação no TCC e recorrência tumoral pela citologia, apenas uma amostra de lavado foi hipermetilada; adicionalmente, essa alteração epigenética não foi detectada nas células do lavado pertencentes aos pares positivos para a hipermetilação no TCC e ausência de recorrência ao exame citológico. Em relação ao gene *RASSF1*, os três pacientes com história de TCC hipermetilado e recorrência tumoral à análise citológica não exibiram hipermetilação do mesmo nas células obtidas do lavado vesical. No entanto, em 2/3 casos mostrando a hipermetilação de *RASSF1* no TCC, mas ausência de recorrência pela análise citológica, células hipermetiladas foram detectadas no lavado. Essa avaliação preliminar evidenciou uma especificidade de 92,8% e 50% para o gene *RARB* e *RASSF1* em relação à detecção de células neoplásicas em lavados, porém uma baixa sensibilidade (16,7% e 0%) para os mesmos genes, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 9. Dados de MSP para os genes *RARB* e *RASSF1* em amostras de lavado vesical submetidas à análise citológica e no respectivo tecido tumoral (tumor primário e/ou recorrências).

Paciente	Lavado Bloco	Diagnóstico do tumor primário (TCC)	Padrão de Metilação		Citologia (lavado)
			<i>RARB</i>	<i>RASSF1</i>	
01	LV 012 B1 (Tu1)	PBGI			P
02	LV 013 B1 (Tu1)	PBGNI			P
03	LV 008 B1 (Tu1) B2 (R1)	PBGNI			N
04	LV 034 LV 052 B1 (Tu1) B2 (Tu1) B3 (R1)	PBGNI			N N
05	LV 011 B1 (Tu1) B2 (Tu1) B3 (Tu1)	PAGNI			N
06	LV 007 LV 044 B2 (R1) B3 (R1)	PBGNI			N N
07	LV 029 B1 (R1) B2 (R2)	BGNI			P
08	LV 033 B1 (Tu1) B2 (R1) B3 (R2) B4 (R3) B5 (R4) B6 (R5) B7 (R5) B8 (R6)	BGNI			P
09	LV 019 B2 (R2)	PBGI			P
10	LV 021 B2 (R2) B3 (R3)	PBGNI			N
11	LV 010 LV 035 B2 (R1)	AGNI			N N
12	LV 015 B1 (Tu1)	PBGNI			N
13	LV 005 B1 (Tu1)	PAGNI			N
14	LV 038 B1 (Tu1)	PAGNI			N
15	LV 017 B1 (Tu1)	PAGNI			N

16	LV 040	PBGNI			N
	B1 (Tu1)				
	B3 (R2)				
	B4 (R3)				
	B5 (R4)				
17	LV 043	PBGNI			N
	B1 (Tu1)				
18	LV 049	AGI			N
	B1 (Tu1)				
19	LV 037	PBGNI			P
	B1 (Tu1)				
20	LV 048	PBGNI			N
	B1 (Tu1)				
	B2 (Tu1)				

PBGNI = tumor papilífero de baixo grau, não invasivo; PBGI = tumor papilífero de baixo grau, invasivo; PAGNI = tumor papilífero de alto grau, não invasivo; BGNI = tumor de baixo grau não invasivo; AGNI = tumor de alto grau não invasivo; AGI = tumor de alto grau invasivo; Tu1 = tumor primário; N = negativo para neoplasia; P = positivo para neoplasia.

	Presença de hipermetilação
	Ausência de hipermetilação
	Não determinado

Tabela 10. Estimativas de acurácia dos resultados de MSP para os genes *RARB* e *RASSF1* realizado em amostras pareadas de tumores primários e/ou recorrências de bexiga e os respectivos lavados vesicais obtidos durante o acompanhamento pós-cirúrgico de pacientes com TCC, para avaliação do potencial preditivo desses marcadores na recorrência da neoplasia.

Grau tumoral	Gene	Teste	Medidas de Acurácia (em %)				
			Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	P*
Baixo	<i>RARB</i>	Lavado	16,7	100,0	100,0	61,5	0,429
	<i>RASSF1</i>	Lavado	0,00	66,7	0,00	60,0	0,467
	<i>RARB</i>	Bloco	83,3	62,5	62,5	83,3	0,138
	<i>RASSF1</i>	Bloco	100,0	60,0	66,7	100,0	0,167
Alto	<i>RARB</i>	Lavado		83,3		100,0	
	<i>RASSF1</i>	Lavado		25,0		100,0	
	<i>RARB</i>	Bloco		33,3		100,0	
	<i>RASSF1</i>	Bloco		50,0		100,0	

* Teste exato de Fisher ($\alpha = 0,05$); VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo.

4.4 MS-AP-PCR (*Methylation-Specific-Arbitrarily Primed PCR*)

A investigação de segmentos diferencialmente metilados pela metodologia de MS-AP-PCR foi realizada pela combinação de diferentes oligonucleotídeos iniciadores. O uso de um trio de oligonucleotídeos compostos por 20 *mers* (Gonzalzo et al., 1997) mostrou maior número de bandas amplificadas. Inicialmente, foram avaliadas 27 amostras pareadas de DNA extraído a partir de tecido a fresco. Em 13 das 26 amostras, foram detectadas diferenças na metilação de dinucleotídeos CpG localizados em sítios *HpaII*. No entanto, após o término da reavaliação histopatológica, a presença de epitélio normal somente foi confirmada em sete pares de tecidos tumoral e normal adjacente ao tumor. Foi observado número reduzido de bandas representando fragmentos genômicos contendo

fragmentos diferencialmente metilados em sítios *HpaII* (Tabela 11). A Figura 9 mostra o perfil de MS-AP-PCR obtido para a amostra 041, exibindo cinco bandas diferencialmente metiladas.

Tabela 11. Distribuição do número de fragmentos genômicos contendo CpG diferencialmente metilados em sítios *HpaII* detectados pela metodologia de MS-AP-PCR em TCCs.

Amostras	Total de bandas diferencialmente metiladas	Bandas HIPERmetiladas no tumor	Bandas HIPOmetiladas no tumor
TCC papilífero de baixo grau não invasivo			
010	3	1	2
011	3	0	3
017	0	0	0
024	2	2	0
041	5	3	2
TCC papilífero de alto grau não invasivo			
022	3	1	2
TCC papilífero de alto grau invasivo			
005	2	2	0
TOTAL		9	9

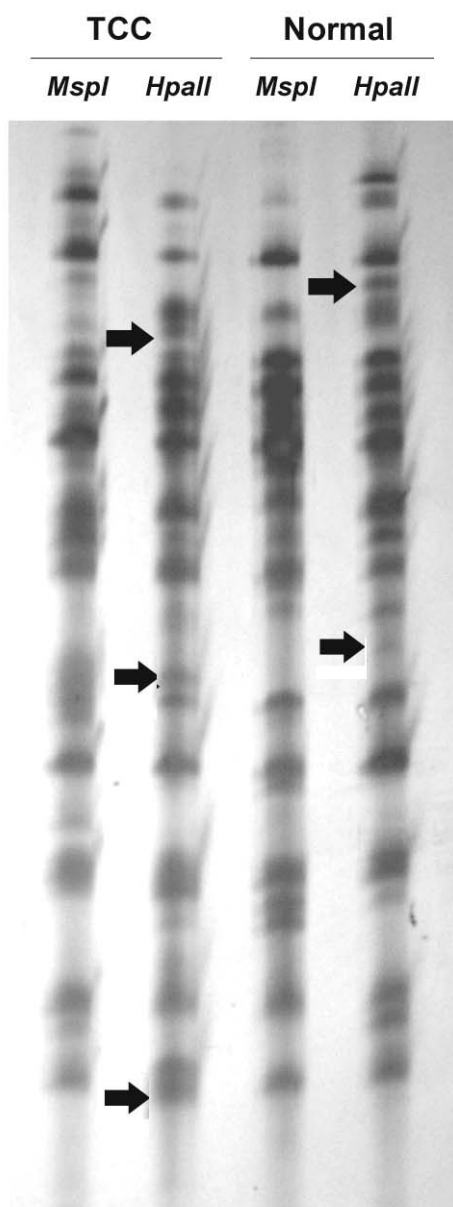


Figura 9. Perfil de MS-AP-PCR do caso 041. Para TCC/*HpaII* estão indicadas as prováveis bandas hipermetiladas e para Normal/*HpaII* as prováveis bandas hipometiladas no tecido tumoral.

Como etapa subsequente, buscou-se a recuperação e a reamplificação dessas bandas para posterior clonagem e identificação do fragmento por seqüenciamento, porém sem sucesso.



5 Discussão

As alterações epigenéticas apresentam uma natureza dinâmica. Esta característica é evidente durante o processo de carcinogênese em que a distribuição e o conteúdo genômico global da metilação do DNA diminui enquanto que as ilhas CpG localizadas essencialmente na região promotora de genes específicos apresentam aumento de metilação. A hipermetilação tem sido consistentemente associada à região promotora de genes supressores tumorais, à inativação da expressão gênica e, conseqüentemente, à progressão tumoral (Jirtle e Skinner, 2007).

No presente estudo, a análise de MSP para os genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* revelou, predominantemente, o padrão hipermetilado entre as amostras analisadas a partir do DNA extraído a fresco, inclusive em uma proporção superior à geralmente encontrada na literatura. Para o gene *CDH1*, as freqüências de hipermetilação descritas em amostras de neoplasias de bexiga variaram entre 9,5% (Friedrich et al., 2005) e 84% (Bornman et al., 2001; Maruyama et al., 2001; Chan et al., 2002; Ribeiro-Filho et al., 2002; Horikawa et al., 2003; Catto et al., 2005; Dhawan et al., 2006; Hoque et al., 2006), independente do tipo histológico. Vale ressaltar que os pares de oligonucleotídeos empregados nesses trabalhos são distintos do par utilizado para a obtenção dos resultados aqui apresentados. Em relação ao gene *SFN*, o único estudo da literatura relatou que a hipermetilação estava presente em 57,1% dos TCC avaliados (Kunze et al., 2006). Entretanto, em nossas análises a freqüência encontrada para ambos os genes foi de 100%. A hipermetilação da região promotora dos genes *RARB* e *RASSF1* nos 48 TCCs avaliados foi de 83,3% e 22,9%, respectivamente. Investigações semelhantes empregando os mesmos pares de oligonucleotídeos, realizadas por Maruyama et al. (2001) e Catto et al. (2005), mostraram 15% e 24% de hipermetilação para o gene

RARB nos TCC de bexiga; para o gene *RASSF1*, esse padrão aberrante foi encontrado em 35% e 54% das amostras investigadas, segundo cada estudo prévio, respectivamente.

As elevadas frequências de hipermetilação, inclusive nas amostras de tecido normal adjacente ao tumor, em sua maioria concordante com o padrão exibido pela amostra tumoral, podem ser explicadas pela alta sensibilidade estimada para a metodologia usada, capaz de detectar uma molécula metilada em 1.000 não metiladas (Herman et al., 1996). Essa sensibilidade é especialmente aumentada com o emprego da uréia durante a modificação pelo bissulfito de sódio (Paulin et al., 1998) e, também, ao serem conduzidas reações do tipo *Nested-PCR*, como no caso da abordagem utilizada para o gene *CDH1*. Assim, a análise de um tecido onde a hipermetilação está presente, ainda que em quantidades bastante reduzidas, quer seja como uma característica inerente ao tecido em estudo quer seja devido a células contaminantes/infiltrantes, esta alteração epigenética é identificada indistintamente.

Como descrito por Lombaerts et al. (2004), produtos de PCR específicos para DNA metilado podem ser observados em amostras com expressão normal de caderina-E devido à presença de leucócitos infiltrantes. Células leucocitárias poderiam confundir a detecção da metilação da região promotora do gene *CDH1* pela MSP identificando erroneamente um fragmento associado a metilação tumor-específica, como sugerido para o tumor mamário. Assim, a detecção de hipermetilação no tecido normal adjacente ao tumor não nos permitiria excluir a ocorrência de falsos-positivos decorrentes de artefatos técnicos, bem como a presença de células normais infiltrantes no tecido tumoral. Bhatia et al. (2003) e Lehmann et al. (2002) identificaram o *status* de metilação do gene *SFN* em células

linfóides e evidenciaram que tanto linfócitos normais quanto transformados apresentam esse gene altamente metilado. Tais achados têm implicações diretas no monitoramento não invasivo de células epiteliais tumorais ocultas por meio de fluidos corporais normalmente contendo linfócitos, sugerindo que esses genes não seriam biomarcadores adequados para análises de MSP.

Somado aos relatos apresentados, que conferem um baixo/moderado poder preditivo aos genes *CDH1* e *SFN*, tem-se a existência de vários subgrupos moleculares de câncer de bexiga (Orntoft et al., 2006). Assim, vale ressaltar a complexidade em se trabalhar com amostras de DNA genômico, uma vez que estas geralmente são formadas por um *pool* de moléculas capazes de exibir heterogeneidade em relação a metilação. Essa heterogeneidade é explicada pelo fato de que os dois alelos de qualquer *locus* genômico de uma célula pode diferir em seus padrões de metilação e, conseqüentemente, a amostra de DNA é derivada de múltiplas células com padrões de metilação potencialmente distintos (Siegmond e Laird, 2002). Portanto, as biópsias variam drasticamente de uma para outra: os tumores são heterogêneos e, além das células tumorais, contêm células do tecido conjuntivo, endoteliais e de resposta imune em quantidades variáveis.

Para que resultados falso-positivos possam ser excluídos, faz-se necessária uma abordagem onde populações homogêneas de células são avaliadas, deste modo, somente o emprego de material microdissecado a *laser* permitiria a obtenção de populações de células puras e completamente isentas de contaminantes (Orntoft et al., 2006). Todavia, devem ser consideradas, ainda, as características particulares do tecido da bexiga. Estudos como os de Paterson et al. (2003), onde foi empregada a microdissecção a *laser*, e de Muto et al., (2000), onde se fez uma microdissecção grosseira usando amostras apresentando 70% de seu

conteúdo em células de interesse, descrevem a ocorrência de alterações genéticas do tipo perda de heterozigose (LOH) e anormalidades no padrão de metilação no epitélio normal adjacente similares àsquelas observadas nos carcinomas. Essas observações sugerem que as alterações no tumor e no estroma acontecem independentemente e que o estroma dos carcinomas uroteliais deve desempenhar um papel importante na carcinogênese de bexiga, corroborando a teoria de “efeito de campo”, inicialmente proposta por Slaughter et al. (1953) para explicar o desenvolvimento de múltiplos tumores primários e cânceres localmente recorrentes.

Focos de células epiteliais morfolologicamente normais exibindo a inativação do gene *TP16* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) em vários tecidos parecem ser precursores para o desenvolvimento tumoral. No tecido mamário, células com ausência de atividade de *p16*(*INK4A*) exibem fenótipos associados a malignidade e foram encontradas tanto em lesões pré-malignas quanto em tecidos morfolologicamente normais adjacentes à lesão (Berman et al., 2005). A alta frequência de hipermetilação encontrada nos tecidos morfolologicamente normais adjacentes ao tumor avaliados em nosso estudo parece refletir essa característica de pré-malignidade em bexiga, principalmente por tratar-se de uma neoplasia com lesões multifocais e com elevados índices de recorrência (Trkova et al., 2006). Nesse contexto, deve-se atentar para o fato de que a hipermetilação do gene *CDH1* foi encontrada em 33,3% das amostras de epitélio normal de bexiga oriundo de pacientes sem tumor avaliadas por Bornman et al. (2001) e Dhawan et al. (2006).

Conforme proposto para os tumores mamários, a detecção da hipermetilação do gene *SFN* em epitélios histologicamente benignos de pacientes com carcinomas pré-invasivo e invasivo permite sugerir que a hipermetilação desse gene se estende para além das margens do tecido canceroso e abrange tecidos

morfologicamente intactos (Umbricht et al., 2001). Esses mesmos resultados, observados por Zochbauer-Muller et al. (2001) para o gene *RARB* em amostras de tecido normal associado ao câncer de pulmão, por Cote et al. (1998) em tecido normal de cólon, e por Bovenzi et al. (1999) em tecido normal de mama, sugerem que a alteração do padrão de metilação desempenha papel importante nas etapas iniciais da progressão tumoral, podendo a presença da hipermetilação em tecidos não malignos representar de fato o aparecimento de lesões pré-malignas.

Aliado a isso, em estudos realizados com amostras tumorais e normais de câncer coloretal humano, Youssef et al. (2004) propuseram que a isoforma embrionária do gene *RARB1* encontra-se hipermetilada nas mucosas do cólon em envelhecimento e em todos os cânceres devido à falta de sua expressão nos tecidos normais. A isoforma adulta *RARB2*, sob controle de uma região promotora distinta da primeira, também exhibe metilação relacionada à idade nos tecidos normais, porém variável nos cânceres coloretais, talvez porque a sua expressão ofereça uma proteção continuada contra a metilação ou o seu silenciamento não provê vantagem seletiva nos estágios iniciais da doença. Além disso, a hipermetilação dos genes *RARB* e *RASSF1* foi encontrada em 42,9% e 13,3% das amostras de epitélio de bexiga normal de pacientes sem tumor avaliadas por Chan et al. (2002) e Dhawan et al. (2006), respectivamente.

Deste modo, ao avaliar o tecido normal adjacente ao carcinoma de bexiga, é compreensível que altas frequências de metilação sejam encontradas, tendo em vista a natureza desse tipo tumoral. Tal alteração epigenética constitui, neste caso, um evento bastante precoce capaz de ser identificado antes mesmo que a anormalidade morfológica seja diagnosticada, dada a extensa exposição do órgão e conseqüente comprometimento de seu tecido como um todo, corroborando mais

uma vez com a teoria da cancerização de campo para a carcinogênese urotelial multicêntrica, já que os pacientes com neoplasia de bexiga freqüentemente apresentam instabilidade genética na mucosa aparentemente normal, além de alterações no urotélio circunvizinho (Cianciulli et al., 2003).

Neste estudo, observou-se uma maior incidência de TCCs em homens, atingido uma proporção de aproximadamente quatro indivíduos do sexo masculino para cada mulher afetada, corroborando informações da literatura que apontam para esse fato (Kirkali et al., 2005; Olfert et al., 2006). Um dado interessante foi que, embora não tenha sido possível estabelecer correlações entre a condição hipermetilada desses genes e qualquer parâmetro clínico e/ou histopatológico do tumor, observou-se que a hipermetilação dos genes *RARB* e/ou *RASSF1* em TCC ocorre mais comumente em indivíduos do sexo masculino. O contraste entre os sexos ainda não está completamente elucidado, acredita-se que a maior incidência de tumores vesicais entre homens seja devida predominantemente a diferenças quanto aos hábitos tabagistas e à exposição ocupacional (Van der Poel et al., 1999).

Os padrões de metilação do DNA se modificam em resposta a mudanças na dieta, polimorfismos genéticos herdados e exposição ambiental. Os grupamentos metil são adquiridos por meio da dieta e doados ao DNA pelas vias do folato e metionina (Ulrey et al., 2005). Alterações nessas vias podem ocorrer em resposta a baixos níveis desses componentes na dieta, ocasionando sérias conseqüências clínicas, como defeitos no tubo neural, câncer e aterosclerose, além de levar à hipometilação e à instabilidade genética. Comportamento semelhante pode ser promovido por agentes ambientais como metais e hidrocarbonetos aromáticos (Rodenhiser e Mann, 2006). Embora essas correlações não possam ser

confirmadas devido à ausência de informações diretas, nossos dados sugerem que especialmente a exposição ocupacional seria uma das razões da alta incidência da neoplasia de bexiga entre os indivíduos do sexo masculino, já que a procedência dos pacientes era essencialmente de regiões agrícolas onde é freqüente a exposição contínua a pesticidas e agrotóxicos (agentes genotóxicos).

Outro fator bastante importante quando se investiga o padrão de metilação de um tecido é a idade do indivíduo no momento da coleta do material. Como proposto por Smith e Pereira-Smith (1996), as alterações epigenéticas estão envolvidas tanto na etiologia quanto nas conseqüências do envelhecimento. Dados observados em glioblastoma mostraram que a metilação relacionada à idade é um evento comum nos tecidos humanos e fator relevante para a hipermetilação observada em cânceres, uma vez que a metilação dos genes *N33* (*tumor suppressor candidate 3*) e *ER* (*estrogen receptor 1*) foi muito mais freqüente nos pacientes mais idosos que apresentavam esse tipo de tumor cerebral maligno (Li et al., 1998).

Adicionalmente, a hipermetilação observada nas amostras de tecido normal avaliadas no presente estudo confirmam alguns resultados já descritos para os mesmos genes avaliados: Bormman et al. (2001) detectaram um padrão semelhante para o gene *CDH1* em tecido normal de bexiga coletado de indivíduos com idade superior a 70 anos; a média de idade dos pacientes incluídos em nossa análise foi de 70,5 anos (amostras pareadas de tecido a fresco). Resultado semelhante foi observado por Issa et al. (1994) em câncer de cólon: a metilação do gene *ER* aumentou linearmente com a idade. Assim, além da metilação relacionada à idade constituir evento comum em tecidos humanos (Toyota e Issa, 1999), alguns estudos revelam que a maioria dos genes freqüentemente metilados em câncer apresenta certo grau de metilação detectável em tecidos normais, como também

apontado por Liang et al. (1998) em carcinomas de cólon, bexiga e próstata, entre outros autores (Tabela 4).

Visando confirmar a credibilidade de nossos resultados quanto a metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* encontrada nas amostras estudadas, esses padrões foram também investigados em duas linhagens epiteliais de TCC de bexiga, 5637 e T24, classificadas como de alto grau e derivadas, respectivamente, de tumores não invasivo e invasivo. Dessa maneira, populações homogêneas de células epiteliais neoplásicas puderam ser avaliadas.

Nessas linhagens, apenas os genes *CDH1* (Wakatsuki et al., 1996; Ribeiro-Filho et al., 2002; Shariat et al., 2005) e *RASSF1* (Lee et al., 2001; Chan et al., 2003; Friedrich et al., 2004) têm relatos de estudos: Chan et al. (2003) observaram metilação completa para *RASSF1* em T24, resultado também observado em nossos ensaios, inclusive para 5637, confirmando a hipótese de que esta alteração epigenética ocorre precoce e freqüentemente em câncer de bexiga, uma vez que o mesmo padrão é observado em tecidos morfológicamente normais adjacentes ao tumor (Friedrich et al. 2004), porém não em linfócitos de indivíduos sadios (Lehmann et al., 2002). Estudos imunohistoquímicos desenvolvidos por Shariat et al. (2005) mostram a ausência de expressão do gene *CDH1* nas linhagens T24 e 5637; além disso, experimentos com a linhagem T24 demonstraram a re-expressão deste gene após tratamento com agente desmetilante sugerindo o envolvimento de tal mecanismo epigenético na inativação do referido gene em TCC de bexiga (Ribeiro-Filho et al., 2002). Os dados de nossos experimentos se assemelham a esses achados uma vez que 100% de metilação foi observada para o gene *CDH1* em ambas as linhagens, fortalecendo a hipótese de silenciamento gênico proporcionado pela metilação e sua associação ao avançado estadiamento

tumoral (Wakatsuki et al., 1996). Em relação aos genes *SFN* e *RARB*, apresentamos resultados pioneiros quanto ao estudo de seu padrão de metilação para as linhagens de carcinoma de bexiga 5637 e T24: a hipermetilação de *SFN* foi observada apenas em 5637 e o gene *RARB* mostrou-se não metilado em ambas as linhagens.

Considerando os diferentes momentos em que as células foram avaliadas, sob distintos estágios de confluência, podemos salientar que, quando cultivadas em condições não restritivas (diferentes daquelas apresentadas em estudo realizado por Pieper et al., 1999), o comportamento epigenético mantém-se estável e portanto, reflete a condição de metilação para os genes estudados.

Em TCC, embora a progressão para a invasão muscular não seja comum, geralmente ocorre a partir de um tumor papilífero inicial. Assim, os pacientes com esse tipo de neoplasia devem ser monitorados regularmente, o que normalmente se faz por meio de exames citoscópicos. Entretanto, o uso de métodos não-invasivos para esse monitoramento seria de grande valia a esse grupo de pacientes (Knowles, 2006); uma "nova-geração" de marcadores seria relevante para o *screening*, com grande potencial de detecção tumoral (Jichlinsk, 2003).

Desta forma, avaliamos o valor preditivo da MSP para a identificação de células tumorais em amostras de lavados vesicais de pacientes submetidos a citoscopia devido a suspeita clínica de carcinoma urotelial ou para acompanhamento pós-cirúrgico para a detecção de recorrência tumoral. Quando possível, a amostra do tumor primário ou recorrência prévia do mesmo paciente sob acompanhamento também foi avaliada. Dentre os pacientes (24) com história tumoral, apenas 33,3% apresentaram citologia positiva para a presença de neoplasia; a média de idade desses pacientes (67,4 anos) foi inferior a daqueles com citologia negativa (69,6 anos).

O padrão hipermetilado para os genes *RARB* e *RASSF1* apenas foi observado entre os sedimentos de lavado quando o mesmo estava presente na amostra correspondente de tumor primário e/ou recorrência anterior. Vale ressaltar que nenhum dos casos pareados em que não havia história de neoplasia anterior (dois casos, resultados não mostrados) apresentou qualquer tipo de hipermetilação em seus respectivos lavados, demonstrando uma tendência à especificidade para o câncer dos genes em questão frente a metilação, corroborando os resultados de Dulaimi et al. (2004) para o gene *RASSF1*.

Considerando o gene *RASSF1*, nove casos/pacientes puderam ter seus resultados diretamente comparados quanto ao padrão de metilação observado na biópsia (tumor primário e/ou recorrência anterior) e lavado *versus* citologia: três foram positivos e seis negativos para a presença de células tumorais segundo a análise citológica. Todos os casos positivos (3/3) exibiram o mesmo padrão para a hipermetilação na biópsia porém, não no lavado. Dentre aqueles negativos para ambos os aspectos, citologia e metilação da biópsia, 2/3 estavam não metilados no lavado sugerindo que o paciente permanece livre da patologia após sua remoção cirúrgica; onde a metilação foi observada (1/3) pode-se sugerir que essa constatação não deriva simplesmente de um artefato técnico, mas sim que a alteração epigenética precedeu a morfológica, ou seja, embora a análise citológica tenha apresentado resultado negativo para a presença de células neoplásicas, o epitélio já possui anormalidades epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento tumoral e, portanto, esse paciente deve ser acompanhado mais cuidadosamente, em intervalos de tempo mais curtos pois está sob alto risco de recorrência. A hipótese de que a presença de metilação para os genes *RARB* e *RASSF1* nas células do lavado é sugestiva de recorrência tumoral é corroborada pelos estudos de Virmani et al.

(2001) e Lehmann et al. (2002) que demonstraram a ausência de metilação em linfócitos de voluntários sem câncer. Essa interpretação também pode ser aplicada aos resultados positivos de MSP em lavados com citologia negativa e biópsia anterior hipermetilada, bem como em relação aos dados encontrados para o gene *RARB*.

Ao ser proposto um novo teste para o diagnóstico e/ou prognóstico de uma dada patologia, é necessário avaliar sua exatidão. Dessa maneira, através da comparação com uma outra abordagem já estabelecida e apropriada, o “padrão-ouro”, é determinada sua real validade quanto a acurácia em determinar a presença ou ausência da doença em questão. Para enfermidades que não são auto limitadas e que habitualmente se tornam manifestas poucos anos após a suspeita inicial, como a maioria dos tipos de neoplasias, os resultados do seguimento podem servir como um teste padrão. Entretanto, se um padrão inacurado de validade é utilizado, um novo teste parecerá inferior mesmo quando estiver mais próximo da verdade (Fletcher et al., 1989).

A comparação dos resultados de MSP estabelecida entre as amostras pareadas de TCC de bexiga e os lavados vesicais desses pacientes sob acompanhamento pós-cirúrgico evidenciou uma especificidade de 92,8% e 50% para os genes *RARB* e *RASSF1* em relação à detecção de células neoplásicas em lavados, porém uma baixa sensibilidade (16,7% e 0%) para os mesmos genes. Considerando que o presente estudo se tratou de uma avaliação preliminar do potencial preditivo desses marcadores na recorrência tumoral, sua ampliação poderá revelar dados mais consistentes.

Como os clínicos comumente usam testes “imperfeitos”, com sensibilidade e especificidade inferiores a 100%, uma única abordagem

freqüentemente resulta numa probabilidade intermediária de diagnóstico da patologia (Fletcher et al., 1989). Assim, pode-se sugerir que a análise do padrão de metilação em células esfoliadas da bexiga constitui uma metodologia menos invasiva e promissora para a detecção precoce de recorrência tumoral e deve ser considerada como um parâmetro complementar à análise citológica de rotina, ou seja, um teste a ser realizado em paralelo, capaz de aumentar a sensibilidade e, portanto, o valor preditivo negativo para a prevalência da doença.

Deste modo, ainda que caracterize uma metodologia menos invasiva, a análise do padrão de metilação em células esfoliadas da bexiga em pacientes sob acompanhamento constitui uma avaliação cujos resultados necessitam ser analisados com cautela para se estabelecer o risco de recorrência desses tumores uroteliais. Embora tenha sido conduzida em um número reduzido de pacientes, a abordagem apresentada foi efetiva na detecção da patologia, porém, para que sua eficiência seja aumentada e resultados falso-positivos possam ser excluídos, é necessário que as células esfoliadas sujeitas à análise de MSP estejam desprovidas de outros tipos celulares que não o tumoral. Aliado a isso se tem o fato de que a hipermetilação dos genes investigados no epitélio normal não é rara, sugerindo que tais marcadores individualmente não seriam suficientemente específicos para o uso num ensaio clínico visando detectar a presença tumoral na urina/lavado, particularmente porque a metilação das células aparentemente normais ocorre na mesma população de células do paciente que estaria sendo alvo para o teste de *screening*, como mencionado por Bornman et al. (2001) para o gene *CDH1* em indivíduos idosos.

A microdissecção de células tumorais e normais adjacentes ao TCC de bexiga, possível em 24 dos casos avaliados a fresco, foi realizada para a

obtenção de subconjuntos celulares homogêneos. Entretanto, não se empregou esse material na avaliação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* já que vários estudos foram desenvolvidos com enfoque nesses genes. Por tratar-se de um material extremamente reduzido, essas células microdissecadas foram e continuam sendo utilizadas em abordagens que possibilitam a obtenção de um perfil de metilação genômico em células normais *versus* tumorais e, conseqüentemente, de um novo gene biomarcador para a neoplasia urotelial em estudo.

Atualmente, as pesquisas estão especialmente voltadas para a identificação de genes hipermetilados em cânceres usando estratégias do tipo gene candidato. Esses estudos proporcionam análise detalhada de dinucleotídeos CpG em sítios específicos, mas não permitem a identificação de novos genes supressores inativados epigeneticamente, e também não permitem uma comparação ampla das alterações epigenéticas entre diferentes tipos de tumores (Yan et al., 2002a;b). Métodos de triagem genômica para a detecção de perfis alterados de metilação tumor-específica representam uma estratégia alternativa para a identificação de novos marcadores tumorais (Ushijima, 2005).

Inicialmente, as ilhas CpG foram identificadas graças aos padrões discordantes de digestão do DNA genômico por enzimas de restrição isosquizômeras que diferiam quanto a sensibilidade à metilação da citosina. A enzima *MspI* (5'CCGG3') tem atividade de endonuclease sobre todo o genoma, porém, o DNA exposto à ação de sua isosquizômera sensível à metilação *HpaII*, que reconhece e cliva o mesmo sítio de restrição mas que não atua sobre este sítio quando a citosina interna encontra-se metilada (5'C^{m5}CGG3'), permanece como DNA de alto peso-molecular. Estima-se que entre 55% a 70% dos sítios *HpaII* seriam metilados em mamíferos (Fazzari e Grealley, 2004). Após a clonagem e

seqüenciamento dos HTFs (fragmentos hipometilados após a digestão com *HpaII*), verificou-se que estes eram ricos em C+G e CpG e foram utilizados como parâmetros para a definição de ilhas CpG. Segundo estes dados preliminares, as ilhas CpG seriam não metiladas (Fazzari e Greally, 2004).

A MS-AP-PCR foi uma das primeiras abordagens utilizadas na detecção de perfis diferenciais de metilação, sendo efetiva na identificação de novos marcadores epigenéticos em cânceres humanos (Liang et al., 1998; 2002). Esta técnica permite a detecção de perfis anormais de metilação pela comparação direta do conjunto de fragmentos amplificados a partir do DNA tumoral ao conjunto de fragmentos obtidos a partir do DNA normal pareado, após a separação dos produtos amplificados pela eletroforese em gel de poliacrilamida (Szabó et al., 2000). No presente estudo, embora essa metodologia tenha sido implantada com sucesso, permitindo a identificação de perfis de metilação diferencial em TCC de bexiga, as bandas hiper e hipometiladas não foram recuperadas nem identificadas. As dificuldades de recuperação do fragmento de interesse podem ser explicadas pela quantidade restrita de DNA presente no fragmento de poliacrilamida recortado e/ou pela presença de grande quantidade de agente desnaturante no gel (uréia 7M), o que requer a introdução de uma etapa adicional de purificação do DNA recuperado a partir do fragmento de poliacrilamida, e pela característica própria da PCR *multiplex*, onde se utilizou três oligonucleotídeos arbitrários para a obtenção do perfil de bandas (entretanto, cada banda amplificada foi resultante do anelamento de dois oligonucleotídeos iniciadores). Todos estes fatores contribuíram para a falta de reamplificação pela PCR dos 18 fragmentos diferencialmente metilados identificados em sete TCCs avaliados por esta abordagem.

Deve-se salientar que outros 19 casos (TCC e NB) foram submetidos à MS-AP-PCR, porém, como não exibiram tecido normal após a reavaliação histopatológica, não tiveram os resultados de sua análise considerados. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que o fragmento a fresco apresentasse o epitélio de interesse. Considerando essa hipótese, foi gerado um total de 43 bandas diferencialmente metiladas, sendo 17 hipermetiladas e 26 hipometiladas (Anexo XI). Esses valores atendem às expectativas ao atentar para a distribuição dos sítios CpG ao longo do genoma humano (Fazzari e Greally, 2004).

O número de sítios de restrição reconhecidos pelas endonucleases de restrição é limitado, assim, o uso de enzimas de restrição também limita a proporção de CpGs que podem ser testadas pela MS-AP-PCR. Além disso, geralmente o número de bandas analisadas em um gel é limitado, o que indica a necessidade de se avaliar número significativo de amostras e de diferentes conjuntos de *primers* arbitrários. Com a melhor caracterização do genoma humano estima-se que 22% dos sítios *HpaII* estão localizados em ilhas CpGs, e que a proporção de sítios CpG localizada dentro de sítios *HpaII* é de 8,04% (4,14% em elementos transponíveis e 3,9% em seqüências únicas), estando a maioria deles localizada em seqüências repetitivas (Fazzari e Greally, 2004).

Neste contexto, atenção deve ser voltada para a condição hipometilada, a qual vem sendo pouco explorada nos estudos das neoplasias, embora sua relação com o desenvolvimento tumoral tenha precedido a da hipermetilação (Gama-Sosa et al., 1983). Ao investigar o carcinoma mamário pela metodologia de MS-AP-PCR e seqüenciamento do DNA modificado pelo bissulfato de sódio, Costa et al. (2006) identificaram um fragmento de DNA satélite altamente hipometilado. Um decréscimo gradativo da metilação dessa seqüência bastante

similar ao DNA satélite SATR-1 foi observado desde as amostras de tecido normal, passando por linhagem celular luminal normal, tecido normal adjacente ao tumor, linhagens tumorais e, finalmente, tecido tumoral primário de mama. Esses resultados indicam que a hipometilação é um evento comum e presente desde os estágios iniciais da tumorigênese mamária, destacando a importância dessa alteração epigenética para o estabelecimento do processo neoplásico.

Adicionalmente, verificou-se que 50% dos sítios *HpaII* estão localizados em *transposons*. Esses valores são menores do que a fração de sítios *HpaII* metilados estimados anteriormente e indicam que muitos sítios *HpaII* localizados em seqüências únicas são metilados em determinado tipo de tecido (Fazzari e Grealley, 2004). A fração muito pequena sítios *HpaII* contidos nas ilhas CpGs associada ao subconjunto de fragmentos que atuam como molde durante a amplificação com os oligonucleotídeos arbitrários são fatores importantes que restringem as chances de identificação de hipermetilação tumor-específica em genes distintos por esta metodologia.

Uma alternativa para tal limitação seria o uso combinado de enzimas de restrição, ou a identificação de diferenças de metilação em sítios *NotI* (5'GCGCCGGCC3'). Ao combinar duas ou três enzimas que preferencialmente tenham seus sítios de corte dentro das ilhas CpG, praticamente todos os fragmentos diferencialmente metilados podem ser avaliados (Li et al., 2002). Embora a ocorrência de sítios *NotI* seja ainda mais limitada em termos de representação quando comparada a dos sítios *HpaII*, a maioria desses está em seqüências únicas (75% dos sítios no genoma humano), dos quais $\frac{3}{4}$ estão dentro de ilhas CpG e estão em associação a genes funcionais. Assim, os sítios *NotI* podem atuar como

marcadores úteis para a detecção de alterações de metilação tumor-específica (Li et al., 2002).

Deste modo, alteramos a estratégia inicialmente proposta, para a triagem de fragmentos genômicos diferencialmente metilados tumor-específico pela MS-AP-PCR. Essa nova abordagem incluiu digestões sucessivas do DNA genômico normal e tumoral, obtido a partir de células microdissecadas a *laser*, pelas enzimas de restrição *MseI* e *NotI*, e ligação de adaptadores às extremidades dos fragmentos gerados na amostra normal. Em seguida, os fragmentos gerados a partir do DNA normal foram amplificados pela PCR usando a seqüência dos adaptadores como iniciadores. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poli-acrilamida neutro e, então, subtraídos do DNA tumoral. Os fragmentos resultantes da hibridação subtrativa foram amplificados, clonados e estão sendo avaliados. Essa estratégia, que representa uma adaptação de protocolos previamente descritos por Brock et al. (2001) e Jiang et al. (2000) e encontra-se descrita em detalhes no Anexo VIII, permite a avaliação de alterações no perfil de metilação da neoplasia de bexiga, constituindo uma ferramenta que em muito contribuirá não somente para o diagnóstico precoce da patologia, ao considerarmos que as alterações epigenéticas estão freqüentemente presentes nos estágios mais iniciais do desenvolvimento tumoral podendo ser detectadas até mesmo um ano antes da formação da lesão ser evidenciada por qualquer outro método (Palmisano et al., 2000), mas também para a progressão da doença. Com o enriquecimento da quantidade de bandas hipermetiladas capazes de serem avaliadas, após a subtração, os fragmentos hipermetilados tumor-específicos permitirão a identificação de inúmeras seqüências. Estas últimas poderão ser empregadas na fabricação de lâminas de *arrays* para o carcinoma de bexiga onde não somente um ou alguns genes estarão sendo

desafiados, mas sim todo um perfil gênico, o que irá conferir maior segurança na avaliação/investigação da patologia entre os indivíduos sob risco.

Dado o exposto, podemos propor as seguintes considerações: a metilação constitui uma alteração bastante precoce no tumor de bexiga, pois as células morfológicamente normais adjacentes ao tumor podem apresentar esse padrão alterado exibindo, deste modo, uma predisposição ao desenvolvimento neoplásico. Entretanto, é preciso ressaltar que em alguns casos a hipermetilação é uma característica própria do epitélio já evidenciada no tecido normal inclusive em indivíduos sadios. Além disso, deve ser ainda lembrado que esse evento epigenético é também influenciado pela idade, sendo o envelhecimento um fator contribuinte para as altas frequências de hipermetilação observadas, aliado à exposição do órgão em estudo como uma barreira primária do organismo contra agentes genotóxicos. A ocorrência de artefatos técnicos não pode ser completamente descartada uma vez que os linfócitos possivelmente infiltrados no tecido tumoral, bem como células inflamatórias, podem apresentar algum padrão de metilação anormal. Deste modo, para que a carcinogênese da bexiga possa ser melhor compreendida quanto às suas características epigenéticas e, por conseguinte, assim diagnosticada e prognosticada, cuidado deve ser tomado no momento da coleta do material a ser investigado para que o resultado não seja comprometido, o que limitaria sua aplicabilidade imediata na rotina.



6 Conclusões

Diante dos resultados apresentados e discutidos, sugerimos que:

- As altas frequências de hipermetilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* no DNA de tecidos tumorais obtidas a partir de biópsias de TCC de bexiga, não associadas a parâmetros clínicos-histopatológicos das lesões, e a presença concomitante destas alterações epigenéticas no tecido adjacente normal, confirmado após reavaliação histopatológica, indicam que os padrões de metilação são eventos muito iniciais no processo de carcinogênese e que são mantidos durante a progressão tumoral;

 - Baseado nos dados de literatura de expressão dos genes *CDH1* e *RASSF1* nas linhagens celulares 5637 e T24, sugerimos que essa alteração epigenética está envolvida com o silenciamento gênico nas células uro-epiteliais e que as mesmas apresentam padrões distintos para os genes *RARB* e *SFN*;

 - Em função da presença de hipermetilação dos genes *CDH1* e *SFN* ter sido previamente relatada como um artefato-técnico devido à presença de infiltrado inflamatório, as frequências de metilação extremamente altas observadas sugerem que esses genes não seriam biomarcadores adequados para análises de MSP, pois não podemos identificar e excluir os resultados falso-positivos na presente casuística;
-

- A hipermetilação do gene *RARB* apresentou uma diferença estatisticamente significativa para TCC em indivíduos do sexo masculino, sendo observada essa mesma tendência para o gene *RASSF1*, embora não tenha sido possível detectar os fatores determinantes desta associação;

- Considerando-se que a hipermetilação apenas foi observada entre os sedimentos de lavado quando estava presente na amostra correspondente de tumor primário e/ou recorrência e que a hipermetilação do gene *RASSF1* foi detectada em uma amostra de lavado com citologia negativa, sugerimos que, embora baseada em dados preliminares e em um pequeno número de amostras, a análise do padrão de metilação em células esfoliadas da bexiga constitui uma metodologia menos invasiva e promissora para a detecção precoce de recorrência tumoral e deve ser considerada como um parâmetro complementar à análise citológica de rotina, ou seja, um teste a ser realizado em paralelo, capaz de aumentar a sensibilidade e, portanto, o valor preditivo negativo para a prevalência da doença;

- A obtenção de perfis exibindo fragmentos diferencialmente metilados entre DNA tumoral e normal obtido de células microdissecadas do epitélio da bexiga pela metodologia de MS-AP-PCR indica que alterações epigenéticas são adquiridas durante o processo de carcinogênese e podem levar à identificação de novo biomarcador para o TCC de bexiga. Devido a dificuldades técnicas, não foi possível identificar os fragmentos diferencialmente metilados, entretanto, um novo protocolo foi sugerido e está sendo conduzido para que esse objetivo possa ser estabelecido.



Referências Bibliográficas

-
- Abol-Enein H, Kava BR, Carmack AJ. Nonurothelial cancer of the bladder. *Urology*. 69(1 Suppl):93-104, 2007.
- Agathangelou A, Cooper WN, Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res*. 65(9):3497-08, 2005.
- Ahmed MN. *Urinary tract cytologic*. New York, Thieme Med Publ Inc, 7, pp.15-23, 1987.
- Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(24):11995-9, 1993.
- Auerbach O, Garfinkel L. Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. *Cancer*. 64(5):983-7, 1989.
- Azarschab P, Porschen R, Gregor M, Blin N, Holzmann K. Epigenetic control of the E-Cadherin gene (CDH1) by CpG methylation in colectomy samples of patients with ulcerative colitis. *Genes Chromosomes Cancer*. 35(2):121-6, 2002.
- Badalament RA, Gray H, Cibas ES, Herr HW, Whitmore WF Jr, Fair WR, Melamed MR. Monitoring endoscopic treatment of superficial bladder carcinoma by postoperative urinary cytology. *J Urol*. 138(4):760-2, 1987.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 6(2):107-16, 2006.
- Berggren P, Steineck G, Adolfsson J, Hansson J, Jansson O, Larsson P, Sandstedt B, Wijkstrom H, Hemminki K. p53 mutations in urinary bladder cancer. *Br J Cancer*. 84(11):1505-11, 2001.
- Berman H, Zhang J, Crawford YG, Gauthier ML, Fordyce CA, McDermott KM, Sigaroudinia M, Kozakiewicz K, Tlsty TD. Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells identify a subpopulation of cells involved in early carcinogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 70:317-27, 2005.
- Berx G, Becker K-F, Höfler H, van Roy F. Mutations of the Human E-Cadherin (CDH1) Gene. *Hum Mutat*. 12(4):226-37, 1998.
- Bhatia K, Siraj AK, Hussain A, Bu R, Gutiérrez MI. The tumor suppressor gene 14-3-3 σ is commonly methylated in normal and malignant lymphoid cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12(2):165-9, 2003.
- Bornman DM, Mathew S, Alsrue J, Herman JG, Gabrielson E. Methylation of the *E-cadherin* gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. *Am J of Pathol*. 159(3):831-5, 2001
-

-
- Bovenzi V, Le NL, Cote S, Sinnott D, Momparler LF, Momparler RL. DNA methylation of retinoic acid receptor b in breast cancer and possible therapeutic role of 5-aza-29-deoxycytidine. *Anticancer Drugs*. 10(5):471–6, 1999.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 1999. Organizado pela Divisão de Epidemiologia e Avaliação/CONPREV/MS. Rio de Janeiro: INCA, 2005. (disponível em <http://www.inca.gov.br>)
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P, Lopez-Abente G, Tzonou A, Chang-Claude J, Bolm-Audorff U, Jockel KH, Donato F, Serra C, Wahrendorf J, Hours M, T'Mannetje A, Kogevinas M, Boffetta P. Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer*. 86(2):289-94, 2000.
- Brock GJ, Huang TH, Chen CM, Johnson KJ. A novel technique for the identification of CpG islands exhibiting altered methylation patterns (ICEAMP). *Nucleic Acids Res*. 29(24):E123, 2001.
- Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zbarovsky E, White M, Minna JD. Epigenetic inactivation of *RASSF1A* in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *J Natl Cancer Inst*. 93(9):691-9, 2001.
- Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *Clin Oncol*. 23(13):2903-10, 2005.
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Tong JH, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin. Cancer Res*. 8(2):464-70, 2002.
- Chan LL, Yeh WT, Yang SY, Wu WJ, Huang CH. Genetic alterations of p16INK4a and p14ARF genes in human bladder cancer. *J Urol*. 170(2 Pt 1):595-600, 2003a.
- Chan MW, Chan LW, Tang NL, Lo KW, Tong JH, Chan AW, Cheung HY, Wong WS, Chan PS, Lai FM, To KF. Frequent hypermethylation of promoter region of *RASSF1A* in tumor tissues and voided urine of urinary bladder cancer patients. *Int J Cancer*. 104(5):611-6, 2003b.
-

-
- Choy KW, Leey TC, Cheung KF, Fan DSP, Loz KW, Beaversony KL, Abramsony DH, Lam DSC, Yu CBO, Pang CP. Clinical implications of promoter hypermethylation in *RASSF1A* and *MGMT* in retinoblastoma. *Neoplasia*. 7(3):200-06, 2005.
- Chung WB, Hong SH, Kim JA, Sohn YK, Kim BW, Kim JW. Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cancer cell lines. *J Korean Med Sci*. 16(6):756-61, 2001.
- Cianciulli AM, Leonardo C, Guadagni F, Marzano R, Iori F, De Nunzio C, Franco G, Merola R, Laurenti C. Genetic instability in superficial bladder cancer and adjacent mucosa: an interphase cytogenetic study. *Hum Pathol*. 34(3):214-21, 2003.
- Cohen SM, Ellwein SL. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res*. 51(24):6493-6505, 1991.
- Cohen SM, Johansson SL. Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol Clin North Am*. 19(3):421-8, 1992.
- Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, Xu HJ, Reuter VE, Benedict WF. Cooperative effects of p53 and pRB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res*. 57(7):1217-21, 1997.
- Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, Fogt F, Forastiere AA, Herman JG, Wu TT. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 7: 2765-9, 2001.
- Costa FF, Paixao VA, Cavalher FP, Ribeiro KB, Cunha IW, Rinck JA Jr, O'Hare M, Mackay A, Soares FA, Brentani RR, Camargo AA. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 165(2):135-43, 2006.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet*. 24(2):132-8, 2000.
- Cote S, Sinnott D, Momparler RL. Demethylation by 5-aza-29-deoxycytidine of specific 5-methylcytosine sites in the promoter region of the retinoic acid receptor b gene in human colon carcinoma cells. *Anticancer Drugs*. 9(9):743-50, 1998.
-

-
- Dammann R, Li C, Yoon J-H, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 25(3):315-9, 2000.
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histol Histopathol.* 20(2):645-63, 2005.
- de Thé H. Altered retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10(9):955-60, 1996.
- Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, Patterson J, Cross SS, Feeley KM, Stephenson Y, Meuth M, Catto JW. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol.* 209(3):336-43, 2006.
- Dominguez G, Carballido J, Silva J, Silva JM, Garcia JM, Menendez J, Provencio M, Espana P, Bonilla F. p14ARF promoter hypermethylation in plasma DNA as an indicator of disease recurrence in bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 8(4):980-5, 2002.
- 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.* 10(6):1887-93, 2004.
- El-Rifai W, Kamel D, Larramendy ML, Shoman S, Gad Y, Baithun S, El-awady M, Eissa S, Khaled H, Soloneski S, Sheaff M, Knuttila S. DNA copy number changes in Schistosoma-associated and non-Schistosoma associated bladder cancer. *Am J Pathol.* 156(3):871-8, 2000.
- 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.* 22(12):1435-48, 1998.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8 (4): 286-98, 2007.
- Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, Rosenthal D, Sacchi N, Gabrielson E, Soito AB, Hung DT, Ljung B-M, Davidson NE, Sukumar S. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet.* 357(9265):1335-6, 2001.
- Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3):186-94, 1998.
-

-
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8(3):175-85, 1998.
- Fackler MJ, Mcveigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, Sukumar S, Argani P. DNA methylation of *RASSF1A*, *HIN-1*, *RAR- β* , *Cyclin D2* and *TWIST* in *in situ* and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer.* 107(6):970–5, 2003.
- Fair WR, Fuks ZY, Scher HI. Cancer of the bladder. In DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer – Principles and Practice of Oncology*. Fourth edition, J.B.Lippincott Co., Philadelphia, 1993.
- Fazzari, MJ, Grealley, JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet.* 5(6):446-55, 2004.
- Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 4(2):143-53, 2004.
- Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H, Marks JR, Lambers AR, Futreal A, Stampfer MR, Sukumar S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(11):6049-54, 2000.
- Fitzpatrick JM, Reda M. Bladder carcinoma in patients 40 years old or less. *J Urol.* 135(1):53-4, 1986.
- Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. *Epidemiologia Clínica – bases científicas da conduta médica*. Artes Médicas, Porto Alegre, 1989.
- Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res.* 10(22):7457-65, 2004.
- Friedrich MG, Chandrasoma S, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Cheng JC, Toma MI, Huland H, Jones PA, Liang G. Prognostic relevance of methylation markers in patients with non-muscle invasive bladder carcinoma. *Eur J Cancer.* 41(17):2769-78, 2005.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands, *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:1827-31, 1992.
-

-
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res.* 11(19):6883-94, 1983.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 196(2):261-82. 1997.
- Gasco M, Bell AK, Heath V, Sullivan A, Smith P, Hiller L, Yulug I, Numico G, Merlano M, Farrell PJ, Tavassoli M, Gusterson B, Crook T. Epigenetic inactivation of 14-3-3 σ in oral carcinoma: association with p16^{INK4a} silencing and human papillomavirus negativity. *Cancer Res.* 62(7):2072-6, 2002.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* 58 (4): 712-25, 2006.
- Gibas Z, Prout G, Connolly JG, Pontes JE, Sandberg AA. Nonrandom chromosomal changes in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 44(3):1257-64, 1984.
- Gontijo AM, Marcondes JP, Elias FN, de Oliveira ML, de Lima RO, Salvadori DM, de Camargo JL. DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. *Environ Mol Mutagen.* 40(3):190-9, 2002.
- Gonzalzo ML, Jones PA. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res.* 386(2):107-18, 1997.
- Gonzalzo ML, Jones P A. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Methods.* 27(2):128-33, 2002.
- Gonzalzo ML, Liang G, Spruck CH 3rd, Sing. J-M, Rideout WM 3rd, Jones PA. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res.* 57(4):594-9, 1997.
- Gordon D, Aabajan C, Green P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8(3):195-202, 1998.
- Greene FL. The American Joint Committee on Cancer: updating the strategies in cancer staging. *Bull Am Coll Surg.* 87(7):13-5, 2002.
- 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.* 17(10):1268-74, 2004.
-

-
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100(1):57-70, 2000.
- Harris AL, Neal DE. Bladder cancer - field versus clonal origin. *N Engl J Med*. 326(11):759-61, 1992.
- Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Méd*. 329(18):1318-27, 1993.
- Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*. 12(1):20-37, 2007.
- 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*. 93(18):9821-6, 1996.
- Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Schoenberg M, Zahurak M, Goodman SN, Sidransky D. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst*. 98(14):996-1004, 2006.
- Horikawa Y, Sugano K, Shigyo M, Yamamoto H, Nakazono M, Fujimoto H, Kanai Y, Hirohashi S, Kakizoe T, Habuchi T, Kato T. Hypermethylation of an E-cadherin (CDH1) promoter region in high grade transitional cell carcinoma of the bladder comprising carcinoma in situ. *J Urol*. 169(4):1541-5, 2003.
- Houle B, Rochette-Egly C, Bradley WEC. Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor β in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(3):985-9, 1993.
- Hu X-C, Loo WTY, Chow LWC. E-cadherin promoter methylation can regulate its expression in invasive ductal breast cancer tissue in Chinese woman. *Life Sci*. 71(12):1397-404, 2002.
- Hurst CD, Fiegler H, Carr P, Williams S, Carter NP, Knowles MA. High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray - based comparative genomic hybridization. *Oncogene*. 23(12):2250-63, 2004.
- Hussain AS, James ND. Molecular markers in bladder cancer. *Semin Radiat Oncol*. 15(1):3-9, 2005.
- Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet*. 7(4):536-40, 1994.
-

-
- Ivanova T, Petrenko A, Gritsko T, Vinokourova S, Eshilev E, Kobzeva V, Kissel'jov F, Kissel'jova N. Methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta2 gene in cervical cancer. *BMC Cancer*. 2:4, 2002.
- Jiang H, Kang DC, Alexandre D, Fisher PB. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(23):12684-9, 2000.
- Jichlinski P. New diagnostic strategies in the detection and staging of bladder cancer. *Curr Opin Urol*. 13(5):351-5, 2003.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 8(4):253-62, 2007.
- Johne A, Roots I, Brockmoller J. A single nucleotide polymorphism in the human H-ras proto-oncogene determines the risk of urinary bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12(1):68-70, 2003.
- Kaihara T, Kusaka T, Nishi M, Kawamata H, Imura J, Kitajima K, Itoh-Minami R, Aoyama N, Kasuga M, Oda Y, Hattori M, Fujimori T. Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*. 22(1):117-23, 2003.
- Kern WH. Screening tests for bladder cancer. In Miller AB (ed.): *Screening for cancer*. Orlando, Academic Press, pp.121-140, 1985.
- Kern WH. Urinary tract. In: *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia, W.B. Saunders, Co., pp.445-76, 1997.
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Bush C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder Cancer: Epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*. 66(6 Suppl 1):4-34, 2005.
- Knowles MA, Elder PA, Williamson M, Cairns JP, Shaw ME, Law MG. Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Res*. 54(2):531-8, 1994.
- Knowles MA. Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk and cheese? *Carcinogenesis*. 27(3):361-73, 2006.
- Knowles MA. Tumor suppressor loci in bladder cancer. *Front Biosci*. 12: 2233-51, 2007.
- Koenig F, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Urinary markers of malignancy. *Clin Chim Acta*. 297(1-2):191-205, 2000.
-

-
- 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*. 18(4): 547-57, 2006.
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, Matsuyama A, Alder H, Mori M, Croce CM. Allele loss and promoter hypermethylation of *VHL*, *RAR-β*, *RASSF1A*, and *FHIT* tumor suppressor genes on chromosome 3p in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63 (13): 3724–8, 2003.
- Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*. 3(4):253-66, 2003.
- Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem*. 275(30):23106-12, 2000.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*. 13(4):1095-107, 1992.
- Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG. Frequent epigenetic inactivation of *RASSF1A* in human bladder carcinoma. *Cancer Res*. 61(18):6688-92, 2001.
- Lehman U, Hasemeier B, Lilischkis R, Kreipe H. Quantitative analysis of promoter hypermethylation in laser-microdissected archival specimens. *Lab Invest*. 81(4):635-7, 2001.
- Levin I, Klein T, Goldstein J, Kuperman O, Kanetti J, Klein B. Expression of class I histocompatibility antigens in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to survival. *Cancer*. 68(12):2591-4, 1991.
- Li Q, Jedlicka A, Ahuja N, Gibbons MC, Baylin SB, Burger PC, Issa JPJ. Concordant methylation of the *ER* and *N33* genes in glioblastoma multiforme. *Oncogene*. 16(24):3197-202, 1998.
- Li J, Protopopov A, Wang F, Senchenko V, Petushkov V, Vorontsova O, Petrenko L, Zabarovska V, Muravenko O, Braga E, Kisselev L, Lerman MI, Kashuba V, Klein G, Ernberg I, Wahlestedt C, Zabarovsky E. *Not1* subtraction an *Not1*-specific microarrays to detect copy number and methylation change in whole genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(16):10724-9, 2002.
-

-
- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 18:1427-31, 2002.
- Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA, Nguyen TT, Nichos PW, Jones PA. DNA methylation differences associated with tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics*. 53(3):260-8, 1998.
- Liang G, Gonzalzo ML, Salem C, Jones PA. Identification of DNA methylation differences during tumorigenesis by methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods*. 27(2):150-5, 2002.
- Lombaerts M, Middeldorp JW, van der Weide E, Philippo K, van Wezel T, Smit VTHBM, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen A-M. Infiltrating leucocytes confound the detection of E-cadherin promoter methylation in tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 319(2): 697-704, 2004.
- Lorenzo-Romero JG, Salinas-Sanchez AS, Gimenez-Bachs JM, Sanchez-Sanchez F, Escribano-Martinez J, Segura-Martin M, Hernandez-Millan IR, Virseda-Rodriguez JA. Prognostic implications of p53 gene mutations in bladder tumors. *J Urol*. 169(2):492-9, 2003.
- Luczak MW, Jagodzinski PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol*. 44(3):143-54, 2006.
- Malmstrom PU, Wester K, Vasko J, Busch C. Expression of proliferative cell nuclear antigen (PCNA) in urinary bladder carcinoma. Evaluation of antigen retrieval methods. *APMIS*. 100(11):988-92, 1992.
- Marsit CJ, Karagas MR, Danaee H, Liu M, Andrew A, Schned A, Nelson HH, Kelsey KT. Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 27(1):112-6, 2006.
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res*. 61(24):8659-63, 2001.
- Masui T, Mann AM, Macatee TL, Garland EM, Okamura T, Smith RA, Cohen SM. Direct DNA sequencing of the rat neu oncogene transmembrane domain reveals no mutation in urinary bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide or N-methyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis*. 12(10):1975-8, 1991.
-

-
- McCabe MT, Davis JN, Day ML. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res.* 65(9):3624-32, 2005.
- Mhaweck-Fauceglia P, Cheney RT, Schwaller J. Genetic alterations in urothelial bladder carcinoma: an updated review. *Cancer.* 106(6):1205-16, 2006.
- Millar DS, Warnecke PM, Melki JR, Clark SJ. Methylation sequencing from limiting DNA: embryonic, fixed, and microdissected cells. *Methods.* 27:108-13, 2002.
- Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA Integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem.* 276(17):14271-8, 2001.
- Muller HM, Fiegl H, Widschwendter A, Widschwendter M. Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1022:44-9, 2004.
- Muto S, Horie S, Takahashi S, Tomita K, Kitamura T. Genetic and epigenetic alterations in normal bladder epithelium in patients with metachronous bladder cancer. *Cancer Res.* 60(15): 4021-5, 2000.
- Nakagawa T, Kanai Y, Saito Y, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. Increased DNA methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 170(6 Pt 1):2463-6, 2003.
- Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S. DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J Urol.* 173(5):1767-71, 2005.
- Nakamura N, Carney JA, Jin L, Kajita S, Pallares J, Zhang H, Qian X, Sebo TF, Erickson LA, Lloyd RV. *RASSF1A* and *NORE1A* methylation and *BRAF*^{V600E} mutations in thyroid tumors. *Lab Invest.* 85(9):1065-75, 2005.
- Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dimopoulous M-A. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Human Pathol.* 29(2):146-54, 1998.
- Neuhausen A, Florl AR, Grimm MO, Schulz WA. DNA methylation alterations in urothelial carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 5(8): 993-1001, 2006.
- Newling DWW, Denis L, Gerard JP, Scalliet PGM, Stoter G. Bladder Cancer. In Peckham M, Pinedo HM, Veronesi (Eds): *Oxford Textbook of Oncology*. Oxford: Oxford University Press, 1995, pp 1459-1479.
-

-
- Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 194(4260):23-8, 1976.
- Okamura K, Miyake K, Koshiakawa T, Asai J. Growth fractions of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Urol*. 144(4):875-8, 1990.
- Olfert SM, Felknor SA, Delclos GL. An updated review of the literature: risk factors for bladder cancer with focus on occupational exposures. *South Med J*. 99(11):1256-63, 2006.
- Orntoft TF, Zieger K, Dyrskjot L. Recent developments in molecular profiling of bladder cancer. *Curr Opin Urol*. 16(5):377-81, 2006.
- Oyasu R. Epithelial tumours of the lower urinary tract in human and rodents. *Food Chem Toxicol*. 33(9):747-55, 1995.
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res*. 60(21):5954-8, 2000.
- Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A. Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*. 10(6):311-22, 2002.
- Paterson RF, Ulbright TM, MacLennan GT, Zhang S, Pan CX, Sweeney CJ, Moore CR, Foster RS, Koch MO, Eble JN, Cheng L. Molecular genetic alterations in the laser-capture-microdissected stroma adjacent to bladder carcinoma. *Cancer*. 98(9):1830-6, 2003.
- Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acid Res*. 26(21):5009-10, 1998.
- Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C. Mechanisms of disease: The epidemiology of bladder cancer. *Nat Clin Pract Urol*. 3(6):327-340, 2006.
- Peterson EJ, Bogler O, Taylor SM. p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res*. 63(20):6579-82, 2003.
- Pieper RO, Lester KA, Fanton CP. Confluence-induced alterations in CpG island methylation in cultured normal human fibroblasts. *Nucleic Acids Res*. 27(15):3229-35, 1999.
- Piura B, Rabinovich A, Aizenberg N, Wolfson M. Cadherins in malignancies of the female genital tract [Article in Hebrew]. *Harefuah*. 144(4):261-5, 2005.
-

-
- Poddighe PJ, Bringuier PP, Vallinga M, Schalken JA, Ramaekers FC, Hopman AH. Loss of chromosome 9 in tissue sections of transitional cell carcinomas as detected by interphase cytogenetics. A comparison with RFLP analysis. *J Pathol.* 179(2):169-176, 1996.
- Prasad GL, Valverius EM, McDuffie E, Cooper HL. Complementary DNA cloning of a novel epithelial cell marker protein, HME1, that may be down-regulated in neoplastic mammary cells. *Cell Growth Differ.* 3(8):507-13, 1992.
- Pratt CI, Wu SQ, Bhattacharya M, Kao C, Gilchrist KW, Reznikoff CA. Chromosome losses in tumorigenic revertants of EJ/ras-expressing somatic cell hybrids. *Cancer Genet Cytogenet.* 59(2):180-90, 1992.
- Przybojewska B, Jagiello A, Jalmuzna P. H-RAS, K-RAS and N-RAS gene activation in human bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 121(1):73-7, 2000.
- Pu RT, Laitala LE, Clark DP. Methylation profiling of urothelial carcinoma in bladder biopsy and urine. *Acta Cytol.* 50(5):499-506, 2006.
- Reznikoff CA, Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, Puthenveetil JA, Jarrard DF, Newton MA. Genetic alterations and biological pathways in human bladder cancer pathogenesis. *Urol Oncology.* 5(5):191-203, 2000.
- Ribeiro-Filho LA, Franks J, Sasaki M, Shiina H, Li L-C, Nojima D, Arap S, Carroll P, Enokida H, Nakagawa M, Yonezawa S, Dahiya R. CpG hypermethylation of promoter region and inactivation of E-cadherin gene in human bladder cancer. *Mol Carcinog.* 34(4):187-98, 2002.
- Ro JY, Staerckel GA, Ayala AG. Cytologic and histologic features of superficial bladder cancer. *Urol Clin North Am.* 19(3):435-53, 1992.
- Rocha AS, Soares P, Fonseca E, Cameselle-Teijeiro J, Oliveira MC, Sobrinho-Simões M. E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology.* 42(6):580-7, 2003.
- Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ.* 174(3):341-8, 2006.
- Sabichi AL, Hendricks DT, Bober MA, Birre MJ. Retinoic acid receptor β expression and growth inhibition of gynecologic cancer cells by the synthetic retinoid N-(4-Hydroxyphenyl) Retinamide. *J Natl Cancer Inst.* 90(8):597-605, 1998.
- Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTech.* 17(5):914-21, 1994.
-

-
- Schulz WA. DNA methylation in urological malignancies (review). *Int J Oncol.* 13(1):151-67, 1998.
- Shariat SF, Matsumoto K, Casella R, Jian W, Lerner SP. Urinary levels of soluble E-cadherin in the detection of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Eur Urol.* 48(1):69-76, 2005.
- Shokeir AA. Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. *BJU Int.* 93(2):216-20, 2004.
- Siegmund KD, Laird PW. Analysis of complex methylation data. *Methods.* 27(2):170-8, 2002.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium – Clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 6(5): 963-8, 1953.
- Smith JA Jr. Patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder and their smoking status. *Cancer.* 86(11):2192-4, 1999.
- Smith JR, Pereira-Smith OM. Replicative senescence: implications for *in vivo* aging and tumor suppression. *Science.* 273(5271):63-7, 1996.
- Spruck CH 3rd, Rideout WM 3rd, Ollimi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC, Nichols PW, Horn T, Hermann GG, Steven K, Ross RK, Yu MC, Jones PA. Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res.* 53(5):1162-6, 1993.
- Swisshelm K, Ryan K, Lee X, Isou HC, Peacocke M, Sager R. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells¹. *Cell Growth Differ.* 5(2):133-41, 1994.
- Szabó PE, Tang SH, Rentsendorj A, Pfeifer GP, Mann JR. Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol.* 10(10):607-10, 2000.
- Szyf M. Utilization of antisense oligonucleotides to study the role of 5-cytosine DNA methyltransferase in cellular transformation and oncogenesis. *Methods.* 27(2):184-91, 2002.
- Tada Y, Wada M, Kuroiwa K, Kinugawa N, Harada T, Nagayama, J, Nakagawa M, Naito S, Kuwano M. MDR1 gene overexpression and altered degree of
-

- methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clin Cancer Res.* 6(12):4618-27, 2000.
- Tada Y, Wada M, Taguchi K, Mochida Y, Kinugawa N, Tsuneyoshi M, Naito S, Kuwano M. The association of death-associated protein kinase hypermethylation with early recurrence in superficial bladder cancers. *Cancer Res.* 62(14):4048-53, 2002.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(6):3740-5, 2002.
- Takai D, Jones PA. The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol* 3(3): 235-40, 2003.
- Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 251(5000):1451-5, 1991.
- Talaska G, Schamer M, Skipper P, Tannenbaum S, Caporaso N, Unruh L, Kadlubar FF, Bartsch H, Malaveille C, Vineis P. Detection of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells of cigarette smokers: association with smoking, hemoglobin adducts, and urinary mutagenicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1(1):61-6, 1991.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair K-W, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa J-P J. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by Methylated CpG island Amplification. *Cancer Res.* 59(10):2307-12, 1999.
- Toyota M, Issa J-PJ. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol.* 9(5):349-57, 1999.
- Trkova M, Babjuk M, Duskova J, Benesova-Minarikova L, Soukup V, Mares J, Minarik M, Sedlacek Z. Analysis of genetic events in 17p13 and 9p21 regions supports predominant monoclonal origin of multifocal and recurrent bladder cancer. *Cancer Lett.* 242(1):68-76, 2006.
- Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Front Biosci.* 3:d208-36, 1998.
- Tsujihashi H, Nakanishi A, Matsuda H, Uejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdUrd and Ki-67 immunostaining. *J Urol.* 145(4):846-9, 1991.
- Turker MS, Bestor TH. Formation of methylation patterns in the mammalian genome. *Mutat Res.* 386(2):119-30, 1997.
-

-
- Ulrey CL, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO. The impact of metabolism on DNA methylation. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No 1:R139-47, 2005.
- 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.* 20(26):3348-53, 2001.
- Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.* 13(5):868-74, 2003.
- Ushijima, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer.* 5(3):223-31, 2005.
- Van der Poel HG, Mungan NA, Witjes JA. Bladder cancer in women. *Int. Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 10(3):207-12, 1999.
- Vauhkonen M, Vauhkonen H, Sipponen P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 20(4):651-74, 2006.
- Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Res.* 62(8):2378-84, 2002.
- Verma M, Dunn BK, Ross S, Jain P, Wang W, Hayes R, Umar A. Early detection and risk assessment: Proceedings and recommendations from the Workshop on Epigenetics in Cancer Prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 983:298-319, 2003.
- Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zochbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 7(3):584-9, 2001.
- Wakatsuki S, Watanabe R, Saito K, Saito T, Katagiri A, Sato S, Tomita Y. Loss of human E-cadherin (ECD) correlated with invasiveness of transitional cell cancer in the renal pelvis, ureter and urinary bladder. *Cancer Lett.* 103(1):11-7, 1996.
- Wallace DM. Occupational urothelial cancer. *Br J Urol* 61 (3): 175-82, 1988.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science,* 254: 1138-46, 1991.
- Wheless LL, Badalament RA, de Vere White RW, Fradet Y, Tribukait B. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer: Report of the DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry.* 14(5):478-81, 1993.
- Widschwendter A, Ivarsson L, Blassnig A, Müller HM, Fiegl H, Wiedemair A, Müller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M. *CDH1* and *CDH13* methylation
-

- in serum is an independent prognostic marker in cervical cancer patients. *Int J Cancer*. 109(2):163–6, 2004.
- Xu XC, Ro JY, Lee JS, Shin DM, Hong WK, Lotan R. Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res*. 54(13):3580-7. 1994.
- Xu Y, Uberbacher EC. Automated gene identification in large-scale genomic sequences. *J Comput Biol*. Fall; 4(3):325-38, 1997.
- Yan PS, Chen CM, Shi H, Rahmatpanah F, Wei SH, Huang TH. Applications of CpG island microarrays for high-throughput analysis of DNA methylation. *J Nutr*. 132(8 Suppl):2430S-2434S, 2002a.
- Yan PS, Efferth T, Chen HL, Lin J, Rodel F, Fuzesi L, Huang TH. Use of CpG island microarrays to identify colorectal tumors with a high degree of concurrent methylation. *Methods*. 27(2):162-9, 2002b.
- 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*. 25(13):1984-8, 2006.
- Yeo W, Wong WL, Wong N, Law BK, Tse GM, Zhong S. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non-tumorous tissue of breast cancer. *Pathology*. 37(2):125-30, 2005.
- Yokota J. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*. 21(3):497-503, 2000.
- Youssef EM, Estecio MR, Issa JP. Methylation and regulation of expression of different retinoic acid receptor beta isoforms in human colon cancer. *Cancer Biol Ther*. 3(1):82-6. 2004.
- Zhang J, Zheng S, Gao Y, Rotolo JA, Xiao Z, Li C, Cheng S. A partial allelotyping of urothelial carcinoma of bladder in the Chinese. *Carcinogenesis*. 25(3):343-7, 2004.
- Zhou HE, Zhang X, von Eschenbach AC, Scorsone K, Babaian RJ, Ro JY, Hung MC. Amplification and expression of the C-erb-B2/neu proto-oncogene in human bladder cancer. *Mol Carcinog*. 3(5):254-57, 1990.
- Zochbauer-Muller 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*. 61(1):249-55, 2001.
-



Anexos

ANEXO I



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail Presidência: mjbvianna@uol.com.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 07 de novembro de 2.003

OF. 500/2003-CEP
MACAH/asc

Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Daisy Maria Fávero Salvadori
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu.

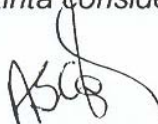
Prezada Profª. Daisy,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "**Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transicionais de bexiga**", de autoria de Priscilla Davidson Negraes, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/11/2003

Tendo em vista a área temática que o projeto está classificado "Genética Humana", deverá seguir para CONEP, para apreciação e parecer final.

Situação do Projeto: APROVADO, NÃO PODENDO SER INCIADO ANTES DE OBTER PARECER DA CONEP

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 6802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail Presidência: mjbvianna@uol.com.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 07 de novembro de 2.003

OF. 501/2003-CEP
MACAH/asc

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Corina B. D. de Freitas
Secretária Executiva da CONEP
Ministério da Saúde -DF

Prezada Drª Corina,

Estou enviando à essa digna CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), do Ministério da Saúde, o Projeto de Pesquisa "Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transicionais de bexiga", de autoria de Priscilla Davidson Negraes orientada pela Profª. Drª. Daisy Maria Fávero Salvadori, do Departamento de Patologia desta Universidade, o qual recebeu deste CEP parecer favorável, aprovado em reunião de 03 de novembro de 2.003

Motivo do envio: Área temática especial "Genética Humana"

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

Maria Ap. C. Arruda Henry
Profª Drª Maria Ap. C. Arruda Henry
Coordenadora do CEP

ANEXO II



Distrito de Rubião Júnior, s/n° - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
 ☎ (014) 821-2121 - Rumnis 2146/2042/2238 - Fax (014) 821-2348

FACULDADE DE MEDICINA
 CAMPUS DE BOTUCATU



Botucatu, 26 de março de 2004

Ilmo Sr.
 Dr. José Getúlio Martim Segalla
 Presidente da Comissão de Revisão de Prontuários Médicos
 Hospital Amaral Carvalho

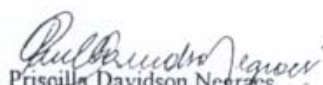
Prezado Senhor

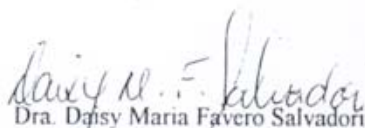
Em anexo, encaminhamos o projeto de pesquisa intitulado "Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transitórias (CCT) de bexiga", de autoria de Priscilla Davidson Negraes, sob nossa orientação, para que seja analisada a possibilidade de colaboração na execução do estudo. Neste sentido, solicitamos autorização para consulta a prontuários e obtenção de fragmentos de biópsia de pacientes com CCT de bexiga.

Antecipadamente, ressaltamos que iremos acatar as normas requeridas pelo Hospital Amaral Carvalho para o desenvolvimento de tal colaboração.

Aproveitamos a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,


 Priscilla Davidson Negraes
 Doutoranda


 Dra. Daisy Maria Favero Salvadori
 Orientadora

A/C Rute Maria Martins Capra
 Setor de Registro Hospitalar do Câncer - RHC
 C/C Dr. Francisco Carlos Quevedo
 Responsável pelo Departamento de Patologia

Recebi desta
 26/03/04
 Indaiva 'G.

unesp UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil

☎ (014) 821-2121 - Ramais 2146/2042/2238 - Fax (014) 821-2348

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

Botucatu, 26 de março de 2004

Ilmo Sr.
Dr. José Getúlio Martim Segalla
Presidente da Comissão de Revisão de Prontuários Médicos
Hospital Amaral Carvalho


Prezado Senhor


Em anexo, encaminhamos o projeto de pesquisa intitulado "Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transitórias (CCT) de bexiga", de autoria de Priscilla Davidson Negraes, sob nossa orientação, para que seja analisada a possibilidade de colaboração na execução do estudo. Neste sentido, solicitamos autorização para consulta a prontuários e obtenção de fragmentos de biópsia de pacientes com CCT de bexiga.

Antecipadamente, ressaltamos que iremos acatar as normas requeridas pelo Hospital Amaral Carvalho para o desenvolvimento de tal colaboração.

Aproveitamos a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

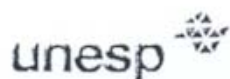

Priscilla Davidson Negraes
Doutoranda


Dra. Daisy Maria Favero Salvadori
Orientadora

A/C Rute Maria Martins Capra
Setor de Registro Hospitalar do Câncer - RHC
C/C Dr. Francisco Carlos Quevedo
Responsável pelo Departamento de Patologia

recebi 26/03/04
Vanessa

ANEXO III



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997



Botucatu, 26 de fevereiro de 2004

OF.28/2004-CEP
MACAH/asc

*Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Daisy Maria Fávero Salvadori
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu*

Prezada Profª. Daisy,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, estou enviando Parecer nº 292/2004-CONEP, referente ao Projeto de Pesquisa "Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transicionais de bexiga", de autoria de Priscilla Davidson Negraes, orientada por Vossa Senhoria.

Situação do Projeto: Aprovado

Sendo só para o momento, aproveito o ensejo para renovar os protestos de elevada estima e distinta consideração.

*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 292/2004

Registro CONEP: 9382 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 1364-2003

Processo nº 25000.131024/2003-91

Projeto de Pesquisa: " Padrão de metilação gênica e sua relação com o prognóstico para o carcinoma de células transicionais de bexiga "

Pesquisador Responsável: Dr^a. Priscilla Davidson Negraes (doutoranda)
Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvatori (orientadora)

Instituição: Faculdade de Medicina/ UNESP- Botucatu, SP.

Área Temática Especial: Genética Humana

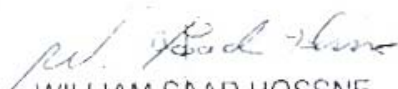
Ao se proceder à análise das respostas ao Parecer CONEP nº 2031/2003, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a- foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b- o projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c- projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 16 de fevereiro de 2004


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO IV

Caracterização das amostras de tecido de bexiga coletadas a fresco, após a reavaliação histopatológica.

Caso/Código	Paciente	Idade (anos)	Sexo	Laudo/Diagnóstico
001	JJMS	60	M	TCC baixo grau não invasivo
002	NS	69	M	TCC alto grau invasivo com componente glandular
003	WRL	52	M	TCC alto grau com células individualizadas e estroma abundante
004	ITM	68	F	TCC alto grau invasivo com componente escamoso
005	GBS	73	M	TCC alto grau invasivo
006	OPO	72	M	TCC alto grau
007	ABS	77	M	TCC papilífero de alto grau invasivo com componente escamoso
008	GF	66	M	TCC papilífero de alto grau não invasivo
# 009	HFS	75	M	Carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado com infiltração do corion e camada muscular própria
010	SC	70	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
011	MA	85	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
012	JP	65	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
013	AV	70	M	Ausência de neoplasia
014	AS	71	M	TCC baixo grau não invasivo
015	LCS	71	F	TCC alto grau invasivo
016	DAS	51	M	TCC alto grau invasivo com componente escamoso
017	AACF	63	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
018	MLGJ	64	F	TCC baixo grau invasivo
019	FPD	80	M	TCC alto grau invasivo
020	BPS	62	F	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
021	LAR	55	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
022	LAF	82	M	TCC papilífero de alto grau
023	LGC	65	M	TCC alto grau invasivo
024	AP	88	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
# 025	ZC	33	F	Endometriose
026	FB	67	M	TCC alto grau invasivo
027	JA	69	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
028	JR	70	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
029	AJB	52	M	TCC alto grau invasivo
030	MAS	72	F	TCC alto grau invasivo
031	LGA	63	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo

032	AG	76	M	TCC papilífero de alto grau não invasivo
033	VSC	40	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
034	DB	67	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
035	NCF	79	F	TCC baixo grau não invasivo
036	SG	70	M	TCC papilífero de alto grau invasivo
037	L	81	F	TCC papilífero de alto grau não invasivo
# 038	RMA	77	M	Cistite crônica com áreas de necrose e acúmulos linfóides
039	BMC	52	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
040	ACG	ND	M	TCC alto grau invasivo com componente escamoso
041	FDVM	76	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
042	JS	72	M	TCC papilífero de alto grau não invasivo
043	AWC	67	M	TCC baixo grau não invasivo
044	JMTF	69	F	TCC papilífero de alto grau
045	MTPF	57	M	TCC papilífero de alto grau
046 *	AJB	52	M	TCC papilífero de alto grau invasivo
047	CO	56	F	TCC papilífero de alto grau
048	SF	80	M	TCC baixo e alto grau
049	SSO	42	F	TCC alto grau não invasivo
050	ZCA	69	F	TCC papilífero de alto grau não invasivo
051	JSN	34	M	TCC baixo grau não invasivo
052	IS	43	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
053	JPM	47	M	TCC baixo grau não invasivo
054	FOG	77	F	TCC baixo grau não invasivo
055	AB	82	M	TCC baixo grau não invasivo
056	AGF	86	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
# 057	BGAS	62	F	Adenocarcinoma com áreas papilíferas e de padrão cribriforme, infiltração do corion e camada muscular própria
058	MFF	68	M	TCC papilífero de alto grau
059	JLL	65	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
# 060	JAM	71	M	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado com extensas áreas de necrose, infiltração neoplásica do corion e camada muscular própria
061	JGZ	70	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
062**	LGA	63	M	TCC papilífero de baixo grau não invasivo
063	AM	79	M	TCC papilífero de alto grau
064	AN	67	M	TCC alto grau com componente escamoso e TCC papilífero de baixo grau
065	LJP	61	M	TCC alto grau invasivo
066	DAG	45	M	TCC baixo grau
067	AC	ND	M	nd

068	AGO	62	M	TCC alto grau invasivo
069	ER	52	M	TCC papilífero de alto grau invasivo
070	JP	68	M	TCC alto grau
071	AC	63	M	TCC baixo grau não invasivo
# 072	AB	90	M	Infiltração por adenocarcinoma ductal
073	MM	87	M	TCC alto grau
074	OF	82	M	TCC alto grau invasivo
075	JDN	79	M	TCC papilífero de alto grau
# 076	SC	58	M	Carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado infiltrando até a serosa

TCC = carcinoma de célula transicionais; nd = não determinado; * - recorrência do caso 029; ** - recorrência do caso 031; # - casos excluídos.

ANEXO V**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TOXICAM****DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA - FMB – BOTUCATU – SP****I. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (VOLUNTÁRIO)**

Nome:		
RG:	Código (não preencher) :	
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

II. TÍTULO DA PESQUISA

PADRÃO DE METILAÇÃO GÊNICA E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DE BEXIGA

Pesquisador-Responsável Priscilla Davidson Negraes e Dra. Daisy Maria Favero Salvadori, Pesquisadora do Departamento de Patologia – Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu - SP. (14) 3882-8255 ; e-mails: negraes@ibb.unesp.br e dfavero@fmb.unesp.br

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE

O objetivo deste estudo é avaliar possíveis alterações genéticas em suas células que possam estar relacionadas ao seu tumor da bexiga. Assim, solicitamos sua autorização para que uma pequena porção da biópsia do tumor, já coletada pelo médico para os exames de rotina, possa ser utilizada em nosso estudo. Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional para sua pessoa, uma vez que o desconforto referente à coleta do material ocorrerá apenas quando o médico for coletar a biópsia para os exames de rotina. Pedimos também sua autorização para que parte desse material possa ser armazenada, sob responsabilidade dos pesquisadores, para estudos futuros.

Esclarecemos que você, a qualquer momento, tem a liberdade de se recusar em contribuir com o estudo, sem ser prejudicado no seu tratamento e acompanhamento médico. Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, mas preservando sua identidade. Os resultados do estudo não trarão benefícios para sua pessoa mas poderão contribuir, no futuro, para a redução do número de casos desse tipo de tumor na população.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo, sempre que solicitados, estarão à sua disposição para o esclarecimento de qualquer questão relacionada à pesquisa.

Ressaltamos que nem os pesquisadores e nem o paciente receberá qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa.

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____
abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade.

_____, _____ de _____ de _____

Paciente

Pesquisador

Pesquisador: Priscilla Davidson Negraes
R. Carlos Guadanini, 2317
Jd. Paraíso II – Botucatu/SP
(14) 3814-4191 negraes@ibb.unesp.br

Daisy Maria Fávero Salvadori
R. Antônio Sabino Santa Rosa, 70 apto 34C
V. Santana - Botucatu/SP
(14) 3882-6748 dfavero@fmb.unesp.br

ANEXO VI

Classificação resumida das lesões uroteliais segundo o WHO-ISUP 1998 (Epstein et al., 1998).

Epitélio normal

Inclui lesões planas com citologia benigna (normal) e com um padrão de arquitetura que exibe desordens mínimas.

Hiperplasia

A *hiperplasia plana* é caracterizada por um epitélio que apresenta mucosa bastante fina desprovida de atipia citológica. Essa lesão pode ser observada na mucosa adjacente a lesões papilíferas de baixo grau, entretanto, por si só não constitui uma lesão com potencial pré-maligno.

A *hiperplasia papilífera* está frequentemente associada a uma história prévia ou simultânea de neoplasias uroteliais papilíferas, o que sugere uma relação entre ambas. Em pacientes sob acompanhamento pode estar associada a um risco aumentado de recorrência.

Lesões com atipia

A *atipia reativa* compreende anormalidades nucleares ocorridas em urotélios aguda ou cronicamente inflamados

A terminologia *atipia de significância desconhecida* é usada em casos de difícil diferenciação entre atipia reativa e neoplásica. As alterações podem se estender para além da inflamação de modo que uma displasia não pode ser descartada com certeza.

Displasia – Neoplasia intraurotelial de baixo grau

Lesões displásicas são frequentemente encontradas em bexigas com neoplasia urotelial. Embora a sua história natural em humanos seja pouco compreendida, há evidências de que a displasia seja uma lesão precursora do carcinoma invasivo, ao menos em alguns casos. A presença dessa lesão em pacientes com tumores de bexiga os coloca em um grupo com maior risco para recorrência e progressão.

Carcinoma in situ (CIS) – Neoplasia intraurotelial de alto grau

Consiste em uma lesão plana do urotélio que em alguns casos antecede (precursor) o carcinoma invasivo. Compreende as alterações previamente denominadas como displasia severa e atipia “marcada”. Por definição, CIS são lesões de alto grau.

Neoplasias uroteliais papilíferas

Papiloma

É definido como uma lesão que apresenta crescimento papilífero discreto alinhado sob um epitélio com citologia e espessura normais. Constitui numa condição benigna rara que tipicamente ocorre como um crescimento pequeno e isolado, primariamente em pacientes mais jovens (não exclusivamente).

O *papiloma invertido*, numa minoria de casos, pode estar associado com o carcinoma urotelial, ocorrendo tanto concomitante como subsequente. Quando removido, exibe um risco de recorrência muito pequeno.

Neoplasia urotelial papilífera com baixo potencial maligno (PUNLMP)

É uma lesão onde as células encontram-se ordenadamente arranjadas em papilas. A principal distinção entre estas lesões e os papilomas consiste no urotélio mais denso e/ou núcleo significativamente maior. Não são observadas atipias quanto à citologia ou padrão de organização. Embora essa lesão não esteja associada com invasão e metástase (exceto raros casos), os pacientes com esse tipo tumoral estão sob um risco aumentado de desenvolvimento de recorrência ou novas lesões. Essas lesões subsequentes, embora geralmente com histologia similar, ocasionalmente são de alto grau e podem progredir (carcinoma).

Carcinomas uroteliais papilíferos de baixo e alto graus

Na tentativa de simplificar o sistema WHO 1973 e evitar um grau intermediário de tumor (grau II), um padrão frequentemente relatado por muitos patologistas, o novo sistema classifica o carcinoma urotelial papilífero em somente dois graus:

O *carcinoma urotelial papilífero de baixo grau* exibe epitélio aumentado, mas tem mínima variabilidade na arquitetura e/ou características citológicas. Pode invadir a lâmina própria e apresenta um baixo risco para progressão (5%), embora frequentemente seja observada recorrência.

Carcinomas uroteliais papilíferos de alto grau são caracterizados por uma aparência predominante ou totalmente desordenada e anormalidades arquiteturais e citológicas marcantes. Apresentam um risco muito maior para progressão (15-40%) quando comparados com as lesões de baixo grau, além de demonstrarem risco aumentado de associação com a invasão no momento de apresentação da doença.

Em casos com histologia variável, a neoplasia deve ser classificada de acordo com o maior grau, embora a prática corrente seja ignorar minúsculas áreas de maior grau tumoral quando atribuindo a graduação geral da lesão.

Neoplasias uroteliais invasivas

Devido às variações no tratamento e no prognóstico quanto à profundidade da invasão do câncer de bexiga, foram desenvolvidas algumas recomendações: a *invasão da lâmina própria* é caracterizada por ninhos, agrupamentos ou células uroteliais únicas dentro da membrana epitelial basal (lâmina própria). Uma característica útil na identificação da invasão é a presença de artefatos de retração ao redor do infiltrado celular, que pode imitar uma invasão vascular. Quando a invasão se estende para o nível médio da lâmina própria, o carcinoma eventualmente infiltrará em pequenos feixes de músculo liso, a camada muscular da mucosa.

A *invasão da muscular própria* é diagnosticada quando o tumor avança infiltrando densamente a parede muscular da bexiga (músculo detrusor).

Os carcinomas invasivos devem ser considerados com baixo e alto grau segundo as premissas usadas para a graduação das lesões não invasivas.

ANEXO VII

Caracterização das amostras de sedimento de lavados vesicais obtidas de pacientes com e sem história de neoplasia urotelial.

Amostra	Lavado coletado em (mês/2006)	Paciente	Idade	Sexo	Citologia para neoplasia	Recorrências desde o diagnóstico do tumor primário
Paciente com história de neoplasia de bexiga						
Tumor primário = TCC papilífero de baixo grau não invasivo						
LV 013	06	CAG	48	F	P	0
LV 019	07	ATP	74	M	P	2
LV 024	08	CPS	64	M	N	1
LV 037	09	DJC	62	M	P	0
LV 043	10	JS	78	M	N	0
LV 046	10	IAC	82	F	N	0
LV 048	11	JAB	47	M	N	0
LV 007	05	SR	80	M	N	1
LV 044	10	SR	81	M	N	
LV 008	06	LV	72	M	N	1
LV 015	06	AAI	42	M	N	0
LV 021	07	WLC	72	M	N	3
LV 030	08	OB	57	M	P	0
LV 034	09	IO	57	M	N	1
LV 052	11	IO	58	M	N	
LV 040	10	JJC	79	F	N	4
Tumor primário = TCC papilífero de baixo grau invasivo						
LV 012	06	RP	82	M	P	0
Tumor primário = TCC papilífero de alto grau não invasivo						
LV 005	05	BAR	78	M	N	0
LV 017	07	ML	57	M	N	1
LV 011	06	RC	82	M	N	1
LV 038	09	LPF	80	M	N	0
Tumor primário = TCC baixo grau não invasivo						
LV 029	08	JCD	57	M	P	2
LV 033	09	ON	84	M	P	5
Tumor primário = TCC alto grau não invasivo						
LV 010	06	AB	74	M	N	1
LV 035	09	AB	74	M	N	
LV 051	11	SV	75	M	P	0

Tumor primário = TCC alto grau invasivo

V 049	11	JZPM	68	M	N	0
-------	----	------	----	---	---	---

Paciente sem história de neoplasia de bexiga**Cistite**

LV 004	05	VSMS	65	F	N	0
LV 014	06	RAA	26	M	N	0
LV 016	07	OASA	42	F	N	0
LV 026	08	FML	82	M	N	0

Ausência

LV 006	05	CMS	86	M	N	0
LV 009	06	MP	64	M	N	0
LV 028	08	WAC	51	M	N	0
LV 031	08	LBS	77	M	N	0
LV 032	08	LSC	54	F	N	0
LV 039	10	RR	77	M	N	0
LV 042	10	RS	59	M	N	0
LV 045	10	MBO	59	F	N	0
LV 001	05	AB	52	M	N	0
LV 023	08	ZPM	68	M	P	0
LV 036	09	SCA	58	F	N	0
LV 002	05	CGS	70	F	N	0
LV 003	05	ACB	57	F	N	0
LV 018	07	MTM	58	F	N	0
LV 020	07	AJG	56	M	N	0
LV 022	07	JFG	44	F	N	0
LV 027	08	JM	44	M	N	0
LV 041	10	nd	nd	nd	N	0
LV 047	10	nd	nd	nd	N	0
LV 050	11	nd	nd	nd	N	0
LV 025	08	nd	nd	nd	nd	0

TCC = carcinoma de células transicionais; N = citologia negativa para neoplasia; P = citologia positiva para neoplasia; nd = não determinado.

ANEXO VIII

OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE HIBRIDAÇÃO SUBTRATIVA

O DNA extraído das células microdissecadas, tumorais e normais adjacentes ao tumor, pertencentes a um mesmo caso (paciente), foi submetido às seguintes etapas, propostas por Brock et al. (2001) e Jiang et al. (2000), com modificações:

** O DNA extraído de células morfológicamente normais de bexiga foi tratado como *driver* e, aquele proveniente de células tumorais, *tester*.

Digestão pela Enzima de Restrição *MseI*

O DNA extraído de cada tipo celular foi submetido à digestão pela enzima de restrição *MseI*, visando a fragmentação do material genômico em estudo. A reação continha 10 mM de Tris-Acetato pH 7,5, 10 mM de acetato de Mg, 50 mM de acetato de K e 25 U da endonuclease *MseI*. As amostras foram incubadas a 37°C durante três horas e, depois de 10 minutos a 65°C para inativação enzimática, procedeu-se à segunda digestão.

Digestão com a Enzima de Restrição Sensível à Metilação – *NotI*

Tanto o DNA *driver* quanto o DNA *tester*, imediatamente após o tratamento com a enzima *MseI*, foram submetidos à digestão pela endonuclease de restrição *NotI*, sensível a metilação, cujo sítio de reconhecimento é 5' - ...GC*GGCCGC... - 3' (*=corte na seqüência não metilada). As condições da digestão foram as mesmas anteriormente descritas, diferindo apenas na quantidade

da enzima empregada, 5 U de *NotI*. Essa reação permaneceu incubada a 37°C durante cinco horas, seguida de 10 minutos a 65°C para a inativação enzimática.

Formação e Ligação dos Adaptadores ao *Driver*

O primeiro par de adaptadores foi formado pelo pareamento dos oligonucleotídeos LA2.1 (5' – TAGTTAACGCGCTGCATGAGTA – 3') e LA2.11 (5' – TACTCATGCAGCGCGTTAAC – 3') (Brock et al., 2001). O pareamento de bases desses oligonucleotídeos foi realizado sob um gradiente de temperatura: 60°C a 30°C, com rampa de 2°C/2min, seguido de 30°C a 14°C, com rampa de 2°C/4min.

Em seguida, adicionou-se 400 U da enzima T4 DNA ligase. Essa mistura foi transferida ao DNA *driver* tratado com as endonucleases *MseI* e *NotI* e incubada a 16°C *overnight*. As condições da reação de ligação dos adaptadores ao DNA *driver* foram de 10 mM de cada oligonucleotídeo adaptador, 10 mM de Tris-Acetato pH 7,5, 10 mM de acetato de Mg, 50 mM de acetato de K.

A amostra de DNA *tester* permaneceu em *freezer* a –20°C.

Amplificação do DNA *driver*

A amostra de DNA *driver*, depois de digerida e ligada aos adaptadores, foi submetida a uma reação de amplificação (PCR) visando aumentar a massa existente de DNA de células normais de bexiga. Assim, foram feitas duas reações réplicas de PCR contendo 400 µM do oligonucleotídeo LA2.11, 200 µM de cada dNTP, 15 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ e 1 U da enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). As condições de

amplificação foram: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos; 25 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 1 ciclo a 72°C por 5 minutos. Em seguida, realizou-se uma reamplificação dos produtos obtidos, em quadruplicata.

As quatro réplicas da reação de reamplificação do DNA *driver* foram reunidas e purificadas utilizando-se o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). O DNA recuperado foi transferido para um microtubo de 0,5 ml cujo volume foi completado com isopropanol absoluto e mantido a -20°C *overnight*.

Hibridação Subtrativa

As amostras de DNA (*driver* e *tester*), centrifugadas a 14.000 rpm durante 40 minutos, tiveram seus sobrenadantes descartados e permaneceram em temperatura ambiente para secar.

Os DNAs *tester* e *driver* foram ressuspensos em 0,4 µl e 7,0 µl de água estéril, respectivamente. Em seguida, o *driver* foi quantificado em NanoDrop para se estimar a quantidade de DNA existente; o processo seria continuado somente se houvesse uma proporção de aproximadamente 50:1 *driver:tester*.

Depois de ressuspensas em 11 µL de tampão de subtração contendo formamida 40%, SDS 0,2%, 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 0,5 M de NaCl, essas amostras foram mantidas a 100°C durante cinco minutos. Transferiu-se, então, o conteúdo do *driver* para o microtubo contendo o *tester* e, após três minutos adicionais à 100°C, essa mistura foi mantida a 42°C durante 48 horas para que ocorresse a formação dos híbridos.

Ao conteúdo submetido à hibridação subtrativa adicionou-se uma mesma quantidade de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) que foi homogeneizada e, após centrifugação a 14.000 rpm durante um minuto, teve o

sobrenadante transferido para a coluna de purificação formada pela resina *Sephacryl S-200 HR* pertencente ao *SureClone Ligation Kit* (Amersham Pharmacia). O volume purificado eluído permaneceu a -20°C acrescido de isopropanol absoluto.

Formação/ ligação dos Adaptadores e Amplificação dos Produtos Subtraídos

A amostra resultante da hibridação subtrativa, depois de purificada e mantida em etanol para precipitação a -20°C *overnight*, foi centrifugada a 14.000 rpm durante 40 minutos. Descartado o sobrenadante, a amostra foi mantida em temperatura ambiente para secar e então ressuspendida em 7,0 μL de água estéril.

Um segundo par de adaptadores foi formado pelo pareamento dos oligonucleotídeos LA2.4 (5' – TACTTCTTGCGCCAAGACGTT – 3') e LA2.44 (5' – AACGTCTTGGCGCAAGAAG – 3') (Brock et al., 2001). O pareamento de bases dos oligonucleotídeos adaptadores foi novamente realizado sob um gradiente de temperatura: 60°C a 30°C , com rampa de $2^{\circ}\text{C}/2\text{min}$, seguido de 30°C a 14°C , com rampa de $2^{\circ}\text{C}/4\text{min}$.

Em seguida, esse conteúdo foi transferido para o microtubo contendo a amostra subtraída e, depois de adicionadas 800 U de T4 DNA ligase, esta mistura foi incubada a 16°C *overnight*. As condições da reação de ligação dos adaptadores ao DNA foram de 10 mM de Tris-Acetato pH 7,5, 10 mM de acetato de Mg, 50 mM de acetato de K.

Terminada a etapa de ligação dos adaptadores ao DNA de interesse, realizou-se uma nova PCR utilizando-se, agora, o oligonucleotídeo LA 2.44 em uma reação contendo 200 μM de cada dNTP, 15 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 e 1 U da enzima AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems).

As condições de amplificação foram: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

A reação de amplificação dos híbridos foi purificada utilizando-se o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). O DNA recuperado (50 µL) foi transferido para um microtubo de 0,2 mL cujo volume foi completado com isopropanol absoluto e mantido a -20°C *overnight*. Após centrifugação a 14.000 rpm durante 40 minutos, o sobrenadante foi descartado e a amostra mantida em temperatura ambiente para secar.

Clonagem e Análise das Seqüências

Os fragmentos amplificados foram clonados utilizando-se o *InsTAclone PCR Cloning Kit* (Fermentas) e transformados em células eletrocompetentes DH10β. As etapas de seqüenciamento e posterior análise dos fragmentos recuperados ainda não foram concluídas.

ANEXO IX

Caracterização das amostras de tecido de bexiga coletadas no período de maio a novembro de 2004 junto ao Departamento de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, SP.

Amostra	Paciente	Idade	Sexo	Data da coleta	Recorrência	Diagnóstico do Tumor Primário	Amostra pareada de epitélio morfológicamente normal no fragmento adjacente ao tumor*
TCC papilífero de baixo grau não invasivo							
010	SC	70	M	06/2004	N	-	+
011	MA	85	M	05/2004	S	TCC pap grau II não inv em 03/2003	+
012	JP	65	M	05/2004	S	-	+
017	AACF	63	M	05/2004	S	TCC pap grau II não inv em 09/2003	+
020	BPS	62	F	06/2004	N	-	-
021	LAR	55	M	06/2004	S	TCC pap grau II inv corion em 01/2002	-
024	AP	88	M	06/2004	N	-	+
027	JA	69	M	06/2004	N	-	+
028	JR	70	M	07/2004	S	TCC "in situ" em 11/2002	-
031	LGA	63	M	07/2004	N	TCC pap grau II não inv em 12/2003	-
062	LGA	63	M	10/2004			-
033	VSC	40	M	07/2004	S	TCC pap grau II não inv em 04/2002	-

034	DB	67	M	07/2004	N	-	+
039	BMC	52	M	08/2004	N	-	+
041	FDVM	76	M	08/2004	N	-	+
042	JS	72	M	08/2004	S	-	+
052	IS	43	M	09/2004	N	TCC pap alto grau em 06/2004	-
056	AGF	86	M	09/2004	S	TCC pap alto grau não invasivo em 01/2001	-
059	JLL	65	M	10/2004	S	TCC pap grau II não inv em 06/2000	-
061	JGZ	70	M	10/2004	S	-	-
066	DAG	45	M	10/2004	N	-	+
067	AC	ND	M	10/2004	S	-	-

TCC papilifero de alto grau não invasivo

008	GF	66	M	07/2004	N	-	-
032	AG	76	M	07/2004	S	-	-
037	L	81	F	07/2004	nd	-	-
050	ZCA	69	F	09/2004	S	-	+
022	LAF	82	M	06/2004	N	-	+
044	JMTF	69	F	08/2004	N	-	-
045	MTPF	57	M	09/2004	S	TCC pap grau I não inv em 03/2004	-
047	CO	56	F	09/2004	N	-	-
058	MFF	68	M	10/2004	N	-	-
063	AM	79	M	10/2004	nd	-	-
070	JP	68	M	11/2004	N	-	-
073	MM	87	M	11/2004	N	-	-
075	JDN	79	M	11/2004	N	-	+

TCC papilifero de baixo grau invasivo

018	MLGJ	64	F	05/2004	N	-	-
-----	------	----	---	---------	---	---	---

TCC papilifero de alto grau invasivo

005	GBS	73	M	05/2004	N	-	+
007	ABS	77	M	07/2004	N	-	-
015	LCS	71	F	05/2004	S	-	-
029**	AJB	52	M	07/2004	N	-	+
046**	AJB	52	M	09/2004	nd	nd	+
023	LGC	65	M	06/2004	N	-	-
026	FB	67	M	06/2004	N	-	-
030	MAS	72	F	07/2004	N	-	-
036	SG	70	M	07/2004	S	-	+
069	ER	52	M	11/2004	N	-	-

TCC baixo grau não invasivo

001	JJMS	60	M	05/2004	N	TCC pap grau II não inv em 09/1998	-
014	AS	71	M	05/2004	N	-	-
035	NCF	79	F	07/2004	N	TCC pap grau II em 01/1997	-
043	AWC	67	M	08/2004	N	-	-
051	JSN	34	M	09/2004	nd	nd	+
053	JPM	47	M	09/2004	N	TCC pap grau II em 11/2003	-
054	FOG	77	F	09/2004	S	TCC pap grau II não inv em 02/2001	+
055	AB	82	M	09/2004	S	TCC pap grau II não inv em 01/2003	-
071	AC	63	M	11/2004	S	TCC pap baixo grau não inv em 04/2002	-

TCC alto grau não invasivo

049	SSO	42	F	09/2004	N	-	+
003	WRL	52	M	05/2004	N	-	-
006	OPO	72	M	07/2004	S	TCC pap grau II invasivo em 06/2001	-

TCC alto grau invasivo

002	NS	69	M	06/2004	S	TCC pap grau I não inv em 09/2003	-
004	ITM	68	F	06/2004	S	TCC grau II inv em 11/1998	-
016	DAS	51	M	05/2004	S	-	-
019	FPD	80	M	06/2004	S	-	+
040	ACG	ND	M	08/2004	N	nd	+
065	LJP	61	M	10/2004	S	-	-
068	AGO	62	M	11/2004	N	-	-
074	OF	82	M	11/2004	S	-	-

TCC de baixo e alto grau

048 ^a	SF	80	M	09/2004	N	-	+
064 ^b	AN	67	M	10/2004	S	-	-

Outros**Carcinoma espinocelular**

009	HFS	75	M	06/2004	N	-	-
060	JAM	71	M	10/2004	N	-	-
076	SC	58	M	11/2004	S	TCC pap alto grau com componente escamoso inv em 09/2004	-

Adenocarcinoma

057	BGAS	62	F	09/2004	N	-	-
072	AB	90	M	11/2004	S	infiltração por adenocarcinoma ductal prostático em 10/2003	-

Endometriose

025	ZC	33	F	06/2004	N	06/2004 ressecção bexiga (tumor)	-
-----	----	----	---	---------	---	----------------------------------	---

Cistite crônica

038	RMA	77	M	08/2004	N	TCC pap grau II em 07/2004	-
-----	-----	----	---	---------	---	----------------------------	---

Ausência de neoplasia

013	AV	70	M	05/2004	S	TCC pap grau II não inv em 07/2003	-
-----	----	----	---	---------	---	------------------------------------	---

TCC = carcinoma de célula transicionais; * após reavaliação histopatológica; ** amostras coletadas do mesmo paciente num intervalo de dois meses; a = TCC baixo e alto grau; b = TCC alto grau com componente escamoso e TCC papilífero de baixo grau; pap = papilífero; inv = invasivo; nd = não determinado.

ANEXO X

Padrões de metilação dos genes *CDH1*, *RARB*, *SFN* e *RASSF1* em amostras de tecido normal e de lesões vesicais.

Amostra	<i>CDH1</i>		<i>RARB</i>		<i>SFN</i>		<i>RASSF1</i>		Recorrências (tempo em meses desde o tumor primário)	Acompanhamentos (tempo em meses desde o tumor primário)	Seguimento (até 11/2006)	Follow-up* (mês/ano)
	U	M	U	M	U	M	U	M				
TCC papilífero de baixo grau não invasivo												
010	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	29	Vivo sem recorrência (01/05)
NB 010	+	+	+	+	+	+	+	-				
011	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (14m)	(4m)	44	Vivo sem recorrência (11/04)
NB 011	+	+	+	+	+	+	+	+				
012	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (20m)	0	30	Vivo sem recorrência
NB 012	+	+	+	+	+	+	+	-				
017	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (22m)	(9m)	38	Vivo sem recorrência
NB 017	+	+	+	+	+	+	+	-				
020	+	+	+	-	+	+	+	-	0	0	29	Perdido para seguimento
NB	+	+	+	+	+	+	+	-				
021	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (29m)	0	58	Vivo sem recorrência
NB	-	-	-	+	+	+	+	-				
024	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	06 morte	Óbito por outras causas
NB 024	+	+	+	+	+	+	+	-				
027	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(4m); (7m); (10m)	19 morte	Óbito por outras causas
NB	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd				
028	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (20m)	0	48	Vivo sem recorrência
NB	+	+	+	+	+	+	+	+				
031	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(4m); (8m); (11m)	35	Vivo sem recorrência
NB	+	+	+	-	+	+	-	-				
033	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (28m)	0	55	Vivo sem recorrência
NB	+	+	+	+	+	+	+	-				
041	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(3m)	27	Vivo sem recorrência
NB 041	+	+	-	+	+	+	+	-				
042	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (36m); 2 (88m)	0	115	Vivo sem recorrência
NB 042	+	+	+	+	+	+	+	-				
059	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (35m) (40m)	(3m); (7m)	77	Vivo sem recorrência
NB	+	+	+	+	+	+	+	-				
061	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (18m)	0	49	Vivo sem recorrência
NB	+	+	+	-	+	+	+	-				

TCC papilífero de alto grau não invasivo

008 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	28	Perdido para seguimento
032 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (16m)	(3m)	57 morte	Óbito por outras causas
037 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	nd	0	27 -08/2004	Perdido para seguimento
50 NB 050	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (31m) Lesão papilífera séssil	0	39	Vivo com a doença
022 NB 022	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	06 morte	Óbito por outras causas
058 NB	+	+	+	-	+	+	+	-	0	0	26	Vivo sem recorrência (05/05)

TCC papilífero de baixo grau invasivo

018 NB	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (17m)	0	29	Vivo sem recorrência
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---------	---	----	----------------------

TCC papilífero de alto grau invasivo

005 NB 005	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	30	Vivo sem recorrência
007 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	-	0	41 morte	Óbito por outras causas (11/04)
015 NB	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (14m)	(4m)	18	Vivo com recorrência (07/06) TCC III ulcerado invasão de corion
029 NB 029	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	19	Vivo sem recorrência (04/06) (após cistectomia radical)
046 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	nd	nd	nd	Perdido para seguimento
023 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(4m)	33	Perdido para seguimento
026 NB	+	+	+	+	+	+	-	-	0	(3m)	04 morte	Perdido para seguimento
030 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	28	Perdido para seguimento
036 NB 036	+	+	+	+	+	+	+	+	0	(2m); (14m)	14 morte	Óbito por outras causas (08/04)
069 NB	+	+	+	+	+	+	+	+	-	0	24	Vivo sem recorrência

TCC baixo grau não invasivo

001 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(5m)	98	Vivo sem recorrência
014 NB	+	+	+	-	+	+	+	-	0	0	07 morte	Óbito por outras causas
035 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(2m); (7m)		Perdido para seguimento
055 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (20m)	0	46	Vivo sem recorrência
071 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (7m)	0	55	Vivo sem recorrência (03/05)
	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd				

TCC alto grau não invasivo

049 NB 049	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	26	Vivo sem recorrência
003 NB	+	+	+	-	+	+	+	+	0	0	30	Perdido para seguimento
006 NB	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (36m)	0	30	Perdido para seguimento
	+	+	+	-	+	+	+	+				

TCC alto grau invasivo

002 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (9m)	0	38	Vivo sem recorrência
004 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (64m); (67m)	0	96	Vivo sem recorrência
016 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (7m)	0	18 morte	Óbito por outras causas (05/04)
019 NB 019	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (8m)	0	09 morte	Óbito por outras causas (03/05)
040 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	nd	Perdido para seguimento
065 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (5m)	0	24	Vivo com a doença, em radioterapia na pelve (09/06)
068 NB	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	26	Perdido para seguimento
074 NB	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (17m); 2 (49m)	0	73	Vivo com a doença lesão papilífera em trígono
	+	+	+	-	+	+	+	-				

TCC papilífero de baixo e alto grau com componente escamoso

TCC NB 048	nd +	nd +	nd +	nd -	nd +	nd +	nd +	nd -	0	0	26	Vivo sem recorrência (11/05)
064 NB	+	+	+	-	+	+	+	-	1 (10m)	(3m)	27	Vivo

Outros**Carcinoma espinocelular**

009 NB	+	+	+	-	+	+	+	+	0	0	02 morte	Óbito por outras causas (08/04)
060 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	(2m)	04 morte	Óbito por outras causas (02/05)
076 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (8m) (10m)	(2m)	12 morte	Óbito por câncer de bexiga com metástase e hidroeletrólítico (09/05)

Adenocarcinoma

057 NB	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	26	Vivo após cistectomia radical pós quimioterapia
072 NB	+	+	+	+	+	+	+	+	1 (12m)	0	37	Perdido para seguimento

Endometriose

025 NB	+	+	+	-	+	+	+	+	0	0	28	Perdido para seguimento
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	-------------------------

Cistite crônica

038 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	0	0	28	Vivo sem recorrência
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----------------------

Ausência de neoplasia

013 NB	+	+	+	+	+	+	+	-	1 (6m) (10m) (24m)	0	40	Vivo com a doença (09/06)
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	--------------------	---	----	---------------------------

M = alelos metilados; U = alelos não metilados; * variável segundo informações de prontuário; NB = tecido normal adjacente ao tumor; m = meses; nd = não determinado pois foi dada prioridade ao congelamento da amostra para reavaliação histopatológica e posterior utilização no procedimento de microdissecação a laser.

ANEXO XI

Número total de bandas diferencialmente metiladas encontrado nos ensaios de MS-AP-PCR

Casos	Número de bandas*	HIPERmetilação tumor-específica	HIPOMetilação tumor-específica
TCC papilífero de baixo grau não invasivo			
010	3	1	2
011	3	0	3
017	0	0	0
021	3	1	2
024	2	2	0
028	3	0	3
031	3	2	1
033	0	0	0
041	5	3	2
059	2	1	1
061	0	0	0
TCC papilífero de alto grau não invasivo			
008	0	0	0
032	3	0	3
022	3	1	2
058	0	0	0
TCC papilífero de alto grau invasivo			
005	2	2	0
023	0	0	0
030	0	0	0
TCC baixo grau não invasivo			
001	2	0	2
014	2	2	0
035	2	0	2
TCC alto grau não invasivo			
003	2	0	2
TCC alto grau invasivo			
002	2	1	1
004	1	1	0
016	0	0	0
074	0	0	0
TOTAL	43	17	26

* diferencialmente metiladas no tecido tumoral de bexiga; TCC = carcinoma de células transicionais