

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

PRISCILA MARIA MANZINI RAMOS

**Avaliação do padrão de metilação da DMR
(*Differentially Methylated Region*) dos genes
IGF2 e *H19* em carcinomas uroteliais**

**BOTUCATU - SP
MAIO/2010**

PRISCILA MARIA MANZINI RAMOS

**Avaliação do padrão de metilação da DMR
(*Differentially Methylated Region*) dos genes
IGF2 e *H19* em carcinomas uroteliais**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho

**BOTUCATU - SP
MAIO/2010**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por iluminar meu caminho, me presenteando com todas as conquistas e me dando força e coragem para superar todos os obstáculos.

À professora Dra. Cláudia Aparecida Rainho, pela oportunidade e orientação nesse trabalho.

Ao Dr. Renato Costa, médico urologista do Hospital Amaral Carvalho, Jaú - SP, pela colaboração com esse estudo nos cedendo não somente as amostras a fresco analisadas como também todas as informações pertinentes aos indivíduos incluídos neste projeto.

Ao professor Dr. João Lauro Viana de Camargo, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela reavaliação histopatológica das amostras para este estudo.

À Dra Priscilla Davidson Negraes e à pós-graduanda Merielen Garcia Nascimento pelo auxílio na coleta e caracterização das amostras que compõem este estudo.

Ao professor Dr. Robson F. Carvalho do Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências da UNESP, pela valiosa contribuição na padronização das reações de PCR em tempo real.

Aos funcionários do Instituto de Biociências de Botucatu, do Departamento de Genética, da Seção de Pós-Graduação e da Faculdade de Medicina de Botucatu - Departamento de Patologia, que trabalharam gentilmente e contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade de participar da avaliação deste trabalho, colaborando ativamente com o meu crescimento profissional e enriquecimento deste estudo.

Aos pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo, na confiança de benefícios indiretos, acreditando no futuro da ciência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos.

Agradecimentos Especiais

Às amigas de laboratório, Daniela, Érika, Gimena e Joana, que estiveram comigo todos os dias compartilhando dificuldades, aprendizados, trabalho e muitas risadas. Obrigada meninas, pela grande ajuda, companheirismo e amizade!

Aos amigos Mytia, D. Ana, Ricardo e Kátia e aos sogros D. Valdete e S. Sebastião, que me acolheram da forma mais carinhosa como uma família e foram parte muito importante e querida de todo esse período.

Aos meus pais, Milton e Lourdes, que desde sempre, em todos os momentos da minha vida, me apoiaram, incentivaram, participaram, me deram forças e nunca mediram esforços para que eu crescesse com as minhas escolhas, sempre confiadas por eles. Obrigada pela presença, pela confiança e pelo incentivo, indispensáveis para seguir em frente todos os dias.

E obrigada ao meu amor Dundun, Luiz Henrique, que apareceu na minha vida na hora certa e dividiu especialmente esse tempo comigo de forma essencial e indispensável, me dando muita força e compartilhando todas as dificuldades, sempre com muito carinho. Sem você teria sido muito mais difícil e os melhores momentos não teriam existido. Te amo!

RESUMO

Os padrões anormais de metilação do DNA, especialmente a hipermetilação de genes com provável função supressora de tumor, representam um dos mais promissores marcadores moleculares do câncer por levarem à inativação funcional de genes críticos. Estudos prévios documentaram altos níveis de expressão do gene *H19* em carcinoma de bexiga recorrentes. O gene *H19* é regulado por *imprinting*, está localizado em 11p15.5 adjacente ao gene *IGF2* (*insulin-like growth factor 2 – somatomedin A*) e codifica um transcrito não codificador de proteínas (micro RNA miR-675). Uma região que atua de forma coordenada no controle da expressão desses genes, chamada DMR (*Differentially Methylated Region*), atua na determinação do *imprinting* recíproco e na expressão mutuamente exclusiva dos genes *IGF2* e *H19*. Ela encontra-se não metilada no homólogo materno e metilada no homólogo paterno e contém sete regiões de ligação da proteína CTCF (proteína bloqueadora do acentuador), que é sensível à metilação do DNA. Um relato prévio da literatura sugeriu que somente o sexto sítio de ligação do fator CTCF apresenta metilação parental específica. Este achado foi correlacionado com o padrão de expressão regulado por *imprinting* dos genes *IGF2* e *H19* em câncer de bexiga. No presente estudo, o padrão de metilação alelo-específico do gene *H19* foi determinado em duas regiões distintas: no sexto sítio de ligação do fator CTCF contido na DMR e no primeiro éxon do gene *H19* utilizando-se três abordagens diferentes: MSRE-PCR-RFLP (*Methylation Sensitive Restriction Enzyme - Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), qMSP (*quantitative real time Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*) para o sexto sítio e MSP-CTPP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two Pair-Primers*) para a região do primeiro éxon em 52 amostras de tecidos normais e/ou tumorais pareados, provenientes de 51 pacientes, coletadas junto ao Serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú-SP. Em adição, duas linhagens celulares derivadas de carcinoma de bexiga, 5637 e T24 e as linhagens HCT116 e DKO, derivadas de câncer de cólon também foram analisadas quanto ao padrão de metilação da DMR correlacionada com a análise de expressão alelo-específica por RT-PCR (*Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) seguida

da genotipagem do RFLP *RsaI*. A análise de MSRE-PCR-RFLP mostrou metilação bialélica em duas amostras tumorais, sendo que em uma delas, este padrão também estava presente no tecido normal. A análise de qMSP revelou uma tendência a níveis maiores de metilação no sexto sítio de ligação do fator CTCF no tecido tumoral em comparação ao normal. Estes dados sugerem hipermetilação do sexto sítio de ligação da proteína CTCF em um subgrupo de carcinomas de bexiga, sendo necessários estudos adicionais para melhor avaliação do potencial uso desse marcador molecular para diagnóstico e prognóstico de câncer urotelial. Este estudo também detectou variação interindividual no padrão de metilação no éxon 1 do gene *H19* por MSP-CTPP: seis amostras mostraram metilação bialélica, cinco mostraram metilação monoalélica e em apenas uma amostra houve discordância entre o tecido tumoral (metilação monoalélica) e normal (metilação bialélica). O significado biológico desta variação requer estudos adicionais.

ABSTRACT

Abnormal patterns of DNA methylation, especially hypermethylation of genes demonstrating tumoral suppressor functions represent one of the most promising molecular markers of cancer because they can lead to functional inactivation of critical genes. Previous studies have documented high levels of *H19* gene expression in recurrent bladder carcinomas. The *H19* gene is regulated by *imprinting*, is located at 11p15.5 adjacent to the *IGF2* gene (insulin-like growth factor 2 - somatomedin A) and encodes a non-coding transcript (micro RNA miR-675). A Differentially Methylated Region (DMR) region acts in a coordinated manner to control the expression of the *IGF2* and *H19* genes by determining their reciprocal *imprinting* and mutually exclusive expression patterns. The *H19*-DMR contains seven potential CTCF-binding sites. These sites are located upstream to the transcriptional initiation site, and the gamete-specific methylation acts as an insulator by precluding CTCF binding in the paternal allele. A previous literature report have suggested that only the sixth CTCF-binding site shows parental specific methylation. This finding was correlated with the *imprinting* expression pattern of *IGF2* and *H19* genes in bladder cancer. In the present study, the allele-specific methylation pattern of the *H19* gene was evaluated in two distinct target regions: the sixth CTCF-binding site located in the DMR and the first exon of the *H19* gene using three different approaches: MSRE-PCR-RFLP (Methylation Sensitive Restriction Enzyme - Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), qMSP (quantitative real time Methylation Specific Polymerase Chain Reaction) for the sixth CTCF-binding site, and the first exon of the *H19* gene was analyzed by MSP-CTPP (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers) in 52 samples of bladder tumors matched to normal adjacent tissues obtained from 51 patients. The samples were collected at the Department of Urology, Hospital Amaral Carvalho de Jau-SP. In addition, two cell lines derived from bladder carcinomas, 5637 and T24 and HCT116 and DKO lines derived from colon cancer were also analyzed concerning the methylation status of DMR correlated with the expression analysis by allele-specific RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) followed by genotyping of the *RsaI* RFLP. The results of MSRE-

PCR-RFLP analysis showed biallelic methylation in two tumoral samples; in one of them this pattern was also detected in the matched normal tissue. The qMSP analysis revealed a trend toward higher levels of methylation in the sixth CTCF-binding site in tumoral cells compared to normal adjacent tissues. These data suggest that the hypermethylation of the sixth CTCF-binding site of *H19*-DMR characterizes a subset of bladder carcinomas. Further studies are clearly needed to better evaluate the potential use of this molecular marker for diagnosis and prognosis of urothelial cancers. This study also found inter-individual variation in the methylation patterns in exon 1 of the *H19* gene by MSP-CTPP: six samples showed biallelic methylation, five showed monoallelic methylation and just one tumoral and normal matched samples showed discordant patterns with monoallelic methylation in the tumoral DNA and biallelic methylation in the normal DNA. The biological significance of this variation requires further studies.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Dados de mapeamento dos <i>primers</i> utilizados no ensaio de MSRE PCR-RFLP para a análise do padrão de metilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR.....	41
Figura 2.	Dados de mapeamento dos <i>primers</i> para a genotipagem da transição A>G utilizada como marcador para diferenciar os alelos na análise de MSP-CTPP.....	44
Figura 3.	Estratégia de MSP-CTPP.....	47
Figura 4.	A. Sequência da DMR flanqueando o sexto sítio de ligação do fator CTCF.....	49
Figura 5.	Dados de mapeamento dos <i>primers</i> para a genotipagem da transição G>A utilizada como marcador para diferenciar os alelos na análise de expressão alelo-específica	57
Figura 6.	Genotipagem do RFLP <i>HhaI</i> em amostras pareadas de DNA normal e tumoral.....	70
Figura 7.	Análise do padrão de metilação alelo-específico por MSRE-PCR-RFLP.....	71
Figura 8.	A) Eletroforese em gel de poliacrilamida para o polimorfismo detectado por CTPP. B) Sequência parcial do éxon 1 do gene <i>H19</i> mostrando a transição A>G em um indivíduo heterozigoto.....	73
Figura 9.	Análise de MSP-CTPP em amostras de DNA normais e tumorais.	74
Figura 10.	Análise do padrão de metilação alelo-específico da DMR na linhagem 5637 antes e após o tratamento com o agente desmetilante 5Aza.....	76

Figura 11.	Expressão do gene <i>H19</i> nas linhagens celulares.....	77
Figura 12.	As quatro linhagens mostraram genótipos homozigotos para o RFLP <i>RsaI</i>	78
Figura 13.	Produtos de amplificação pela PCR com os <i>primers</i> desenhados para os ensaios de qMSP.....	79
Figura 14.	Curva de amplificação dos alelos metilados (M), não metilado (U) e normalizador (ACTB).....	81
Figura 15.	A linhagem HCT116 mostra manutenção do <i>imprinting</i> do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR, enquanto que a DKO, que possui desmetilação biológica, não mostra a amplificação de alelos não metilados.....	82
Figura 16.	Padronização da amplificação do normalizador ACTB.....	83
Figura 17.	Padronização da amplificação dos alelos metilados.....	84
Figura 18.	Padronização da amplificação dos alelos não metilados	85
Figura 19.	Quantificação relativa (QR) dos alelos não metilado e metilado do sexto sítio de metilação da DMR do gene <i>H19</i> entre amostras pareadas de tumores uroteliais e tecido normal adjacente ao tumor.....	86
Figura 20.	Quantificação relativa (QR) dos alelos não metilado e metilado do sexto sítio de metilação da DMR do gene <i>H19</i> de tumores uroteliais e tecido normal adjacente ao tumor.....	87
Figura 21.	Quantificação relativa do alelo metilado no sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR do gene <i>H19</i> em relação aos parâmetros clínico-patológicos.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no presente estudo.....	39
Tabela 2.	Características demográficas e clínico-patológicas dos casos de carcinomas uroteliais estudados.....	60
Tabela 3.	Análise do padrão de metilação alelo-específico em carcinomas uroteliais.....	62
Tabela 4.	Resultados do ensaio de metilação alelo-específica da DMR e do padrão de expressão do gene <i>H19</i> em linhagens celulares derivadas de carcinomas humanos.....	74
Tabela 5.	Quantificação da metilação do DNA no sexto sítio de ligação do fator CTCF.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCC	Transitional Cell Carcinoma
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
RISC	RNA-induced Silencing Complex
Ct	Cycle Threshold
dbSNP	Database of Single Nucleotide Polymorphisms
5Aza	5 aza 2´desoxicitidina
DMR	Differentially Methylated Region
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNMT	DNA methyltransferase
dNTP	Deoxyribonucleotideo Triphosphate
HRM	High Resolution Melting
ISUP	International Society of Urological Pathology
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MSP-CTPP	Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers).
MSRE	Methylation Specific Restriction Enzyme)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism
LOI	Loss of <i>imprinting</i>
LOH	Loss of Heterozygosity
pri-miRNA	primary micro RNA
qMSP	quantitative Methylation Specific Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
AJCC	American Joint Committee on Cancer
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	14
Câncer de bexiga	14
Epigenética e câncer	16
Genes <i>H19</i> e <i>IGF2</i>	19
Expressão e <i>imprinting</i> dos genes <i>H19</i> e <i>IGF2</i> em câncer de bexiga	23
miRNA e Câncer.....	27
II. OBJETIVOS.....	32
Objetivos específicos.....	32
III. MATERIAL E MÉTODOS	34
Caracterização da amostra.....	34
Cultura das linhagens celulares.....	36
Obtenção do DNA genômico.....	37
III.1. Detecção do padrão de metilação alelo-específico da DMR baseada em MSRE (<i>Methylation Specific Restriction Enzyme</i>) seguida da análise de PCR-RFLP (<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	40
III.2. Detecção do padrão de metilação alelo-específico baseada em MSP-CTPP (<i>Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers</i>)	43
III.3. Quantificação da metilação do DNA no sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR por qMSP (<i>quantitative Methylation Specific Polymerase Chain Reaction</i>).	47
Avaliação preliminar <i>in silico</i> e seleção de oligonucleotídeos para a amplificação dos sítios de ligação do fator CTCF na DMR.	47
Análise de quantificação da metilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR	50
Determinação de Curvas-Padrão	51
III.4. Análise do padrão de expressão alelo-específico do gene <i>H19</i>	54
Extração de RNA e síntese de cDNA.....	54
Avaliação da qualidade do cDNA obtido.....	55

Análise de expressão alelo-específica.....	55
III.5 . Análise Estatística.....	57
IV. RESULTADOS.....	59
V. DISCUSSÃO.....	89
VI. CONCLUSÕES.....	101
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
ANEXO 1.....	111
ANEXO 2.....	114
ANEXO 3.....	115

I. INTRODUÇÃO

Câncer de bexiga

O câncer de bexiga está entre os mais comuns, seguindo os cânceres de próstata, mama, pulmão, cólon e gástricos. Apesar de poder ocorrer em qualquer idade, a incidência desta neoplasia aumenta diretamente com a idade, sendo o diagnóstico mais frequente entre 5ª e 7ª décadas de vida, maior incidência em caucasianos e cerca de três vezes mais frequente em homens do que em mulheres (Jemal et al., 2008). No Brasil, ocorreram 2821 óbitos por câncer de bexiga em 2008, e houve uma estimativa de 13.110 novos casos para 2009 (INCA).

Hematúria, microscópica ou macroscópica, indolor e intermitente é o sintoma mais comum. Sintomas irritativos do trato urinário, urgência e disúria, também constituem apresentações frequentes (Kirkali et al., 2005).

O diagnóstico histopatológico dos carcinomas uroteliais recebeu nova classificação em 1998 de acordo com WHO (Organização Mundial da Saúde) e a *International Society of Urological Pathology*, que classificaram os tumores uroteliais em quatro categorias: papiloma; papiloma neoplásico de baixa malignidade; carcinoma de baixo grau e carcinoma de alto grau (Epstein et al., 1998). O estadiamento histológico do tumor primário é baseado na extensão da penetração ou invasão da parede da bexiga, de acordo com o sistema TNM (*American Joint Committee on Cancer – AJCC - 2002*). O estadiamento do câncer de bexiga tem por objetivo determinar se a doença é superficial ou invasiva (comprometimento muscular) e se sua extensão é loco-regional ou metastática (Pompeo et al., 2006).

As neoplasias da bexiga urinária são em geral de natureza epitelial, sendo que 90% dos casos são de células transicionais, 5% são carcinomas de células escamosas e apenas 2% dos tumores são diagnosticados como adenocarcinomas (Kaufman et al., 2009). Ao diagnóstico, aproximadamente 70% dos pacientes com carcinoma de células transicionais (TCC) apresentam doença superficial (Gallagher and Millowski, 2009).

Devido à natureza multifocal desta doença e de ressecções cirúrgicas incompletas, 50 a 70% dos pacientes apresentam recorrência nos primeiros 5 anos, e de 10 a 20% dos pacientes irão progredir para uma doença invasiva (Sarkis et al., 2004).

O diagnóstico da doença é feito pela identificação macroscópica de lesão seguida por cistoscopia e confirmação histológica do diagnóstico. Porém, esses são procedimentos invasivos e não isento de complicações. Alguns tipos de lesões, como o carcinoma *in situ* (CIS) e lesões planas recorrentes podem não ser identificadas pela cistoscopia. Assim, a citologia urinária é o exame mais utilizado, apesar de reduzida sensibilidade, possui alta especificidade no caso de resultado positivo. Os exames de imagem apresentam alta sensibilidade na detecção de tumores acima de 0,5cm e são amplamente utilizados devido ao seu baixo custo e por não serem invasivos, sendo a ressecção transuretral realizada posteriormente para diagnóstico definitivo (Pompeo et al., 2006).

Em busca de um diagnóstico mais preciso e não invasivo, diversos marcadores moleculares detectáveis na urina têm sido investigados. Vários tipos de testes detectam a presença de antígenos e outras proteínas associadas às neoplasias uroteliais. Apesar de promissores, a acurácia dos novos marcadores

moleculares ainda não é suficiente para substituir os exames convencionais (van Rhijn et al., 2005).

O câncer de bexiga é um dos principais exemplos de carcinogênese de contato. Carcinógenos absorvidos pela pele, inalados ou ingeridos via oral tem seu mecanismo de excreção eminentemente renal e por isso estão concentrados na urina. O urotélio sofre alterações pré-neoplásicas que podem progredir para uma neoplasia estabelecida. O tabagismo é o principal fator de risco. Várias substâncias identificadas na fumaça do cigarro mostram-se relacionadas à carcinogênese e consideráveis evidências sugerem que o DNA é o alvo desses agentes, que aparentemente determinam mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumores (Sarkis et al., 2004). O consumo de grandes quantidades de analgésicos por longo tempo também está associado ao maior risco de desenvolvimento da doença (Pompeo et al., 2006). Muitos componentes tóxicos ambientais são suspeitos de terem um potencial efeito na metilação do DNA, organização da cromatina e histonas (Vaissière et al., 2008). Irritação crônica como no caso de uso de cateter ou infestação por *Schistosoma haematobium* também podem ser fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de bexiga (McDougal et al., 2008).

Dentre os fatores genéticos, a ação de oncogenes, a repressão de genes supressores tumorais entre outros, podem ter papel importante na carcinogênese de bexiga (Kaufman et al., 2009).

Epigenética e câncer

O termo epigenética é utilizado para definir as mudanças herdáveis na expressão gênica que não estão associadas com a variação genética (Costa, 2008).

Os mecanismos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento, diferenciação celular, proteção contra genomas virais e parece ser crítico para a integração de sinais endógenos e ambientais durante a vida celular ou do organismo como um todo. Mecanismos epigenéticos incluem a inativação do cromossomo X, a metilação do DNA sítio específica, as modificações covalentes pós-traducionais de histonas, silenciamento gênico mediado por RNA e o *imprinting* genômico (Salozhin et al., 2005; Vaissière et al., 2008). Esse tipo de regulação tem sido observada em um largo espectro de organismos, vegetais e animais, sugerindo que o fenômeno é conservado (Peterson et al., 1993).

Além de muitas mutações e aberrações cromossômicas já descritas em câncer, a regulação epigenética da expressão gênica acrescenta um mecanismo alternativo de ativação de proto-oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor (Cooper et al., 1996).

Metilação e *imprinting* genômico

Eventos epigenéticos são cruciais no controle de células normais e eventos anormais podem estar associados com o desenvolvimento de câncer.

As citosinas imediatamente seguidas por uma guanina, compreendendo os dinucleotídeos CpGs, aparecem em menor proporção que o esperado no genoma humano. Porém, algumas regiões denominadas ilhas CpG são particularmente ricas nestes dinucleotídeos e se concentram em regiões promotoras de genes (Rainho et al., 2004). Em mamíferos, a metilação no carbono 5 da citosina, catalisada por enzimas da família das DNA metiltransferases responsáveis pela adição de um grupo metil nas citosinas, é a principal modificação epigenética do DNA,

praticamente restrita as citosinas dos dinucleotídeos CpG e base do *imprinting* genômico (Salozhin et al., 2005).

O *imprinting* genômico é uma forma de regulação na qual os dois alelos parentais de um gene são diferencialmente expressos (Feinberg, 1999), resultando em uma expressão monoalélica do mesmo. Ele foi descoberto no início dos anos 80 e é definido como uma modificação epigenética gameta dependente, ou seja, é dependente do sexo de onde se originou o material genético. Assim, alguns genes podem funcionar diferentemente dependendo da origem parental dos alelos. No início desta mesma década, algumas pesquisas com animais experimentais revelaram que os genomas paternos e maternos são funcionalmente não equivalentes, mas são conjuntamente essenciais para o desenvolvimento normal do embrião (Cui, 2007). Essa modificação do material genético é reversível entre gerações, ou seja, um alelo que é inativo em uma geração pode se tornar ativo em uma geração subsequente. A maioria dos genes controlados por *imprinting* (aproximadamente 80%) está fisicamente ligada a outros genes controlados da mesma forma. Acredita-se que a organização em *clusters* seja um reflexo da regulação coordenada dos genes localizados no mesmo domínio cromossômico (Reik et al., 2001; Peterson et al., 1993). Evidências bioquímicas do *imprinting* também vieram com a descoberta dos genes *IGF2* e *H19*, quando pesquisadores descobriram que a herança materna do alelo não produzia nenhum fenótipo detectável, diferente da herança paterna de mutações no gene *IGF2* (Peterson et al., 1993).

Durante a gametogênese, um alelo é epigeneticamente marcado de forma que distinga ele do seu homólogo no zigoto. Esse processo resulta em um *locus* que é epigeneticamente hemizigoto. A combinação de alelos paternos e maternos

controlados por *imprinting* é necessária para o sucesso do desenvolvimento embrionário (Peterson et al., 1993). Uma vez estabelecido, o padrão epigenético é estavelmente propagado para muitas gerações celulares. A perda da regulação desse padrão tem um papel importante no processo da tumorigênese (Vaissière et al., 2008).

Com a descoberta do primeiro gene controlado por *imprinting* no início dos anos 1990 foi observado que o fenômeno tinha um importante efeito sob doenças genéticas humanas (Reik et al., 2001). Atualmente, dezenas de genes regulados por *imprinting* foram identificados no genoma humano (<http://www.geneimprint.com>). Os genes *H19* e *IGF2* são exemplos particularmente bem documentados. Localizados em 11p15.5, estes genes estão ligados e são expressos de forma mutuamente exclusiva (Zhang e Tycko, 1992). O gene *H19* codifica um transcrito não traduzido, expresso maternamente e o *IGF2* codifica o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-II), que é o principal agente mitogênico fetal mostrando expressão exclusiva do alelo paterno. A expressão monoalélica parental–específica destes genes é importante para o crescimento e desenvolvimento normais e, alterações deste padrão têm sido associadas a doenças humanas, incluindo o câncer.

Genes *H19* e *IGF2*

Inicialmente, o envolvimento do gene *H19* no câncer foi sugerido pela sua provável ação supressora de tumor. Hao et al. (1993) observaram um atraso do crescimento e mudanças morfológicas quando linhagens celulares tumorais foram transformadas com um vetor de expressão contendo este gene. Além disso, a diminuição ou a ausência de expressão do *H19* foi associada com a perda da função

inibidora do crescimento. Segundo Hoffman e Vu (1996), o fato do gene *H19* ser normalmente expresso de forma monoalélica é potencialmente importante, pois a perda ou mutação no alelo materno deixaria a célula sem a sua atividade supressora de tumor e, portanto, contribuiria para a transformação neoplásica.

A ligação entre perda de *imprinting* e desenvolvimento de malignidades começou a ser observada em pacientes com tumor de Wilms, quando freqüentemente se observava a perda de heterozigose da região do cromossomo 11p15.5 onde estão mapeados os genes *IGF2* e *H19*, com perda preferencial do alelo materno. Quando não havia perda de heterozigose, a região apresentava hipermetilação do sítio no alelo materno do promotor do *H19*, um mecanismo epigenético de inativação do *H19*, o que também sugeria que o *H19* pudesse ser um gene com propriedades supressora de tumor (Cooper et al., 1996). A proposta de o gene *H19* ser supressor de tumor também advém do fato de alguns tipos de tumores estarem acompanhados pela perda da porção do cromossomo materno em 11p15.5 e pela frequência de dissomia uniparental paterna dessa porção cromossômica. Porém pouco é conhecido sobre a possível relação entre a expressão do *H19* e tumorigênese, já que resultados obtidos não sustentam a proposta, uma vez que o gene se encontra expresso em altos níveis em alguns tipos de cânceres (Elkin et al., 1995).

Um centro regulador do *imprinting* foi sugerido como um domínio chave que atua de forma coordenada na regulação da expressão dos genes *IGF2* e *H19* (Thorvaldsen et al., 1998; Bell e Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000). Este centro determina o *imprinting* recíproco e a expressão mutuamente exclusiva destes genes (silencia o alelo materno de *IGF2* que é expresso exclusivamente pelo alelo paterno, enquanto que o *H19* é somente expresso pelo alelo materno, estando o paterno

reprimido) (Li et al., 1993) e baseia-se em duas regiões reguladoras: a primeira é constituída por dois acentuadores localizados *downstream* ao gene *H19* e, a segunda, é uma região diferencialmente metilada (DMR) de 2Kb *upstream* ao *H19* (Feil e Khosla, 1999; Bell e Felsenfeld, 2000; Ishihara et al., 2000). Uma deleção nesta região resulta na perda do *imprinting* tanto do gene *H19* quanto do *IGF2* (Thorvaldsen et al., 1998).

Sob condições normais, a metilação da DMR no homólogo paterno atuaria como um centro de inativação que “silenciaria” a expressão do gene *H19*, enquanto a ausência da metilação no cromossomo materno permitiria a ligação da proteína bloqueadora do acentuador (CTCF), que atuaria como uma barreira ou isolante da cromatina impedindo a interação entre o gene *IGF2* e os elementos acentuadores localizados *downstream* (Reik e Murrell, 2000; Bell e Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000). A CTCF é uma fosfoproteína do tipo *zinc finger* evolutivamente conservada (Ohlsson et al., 2001).

Assim, a região promotora do gene *H19* ou *H19*-DMR é considerada um importante ponto de controle do *imprinting* neste *locus*. Ela contém sete regiões de ligação da proteína CTCF no genoma humano e quatro sítios de ligação no genoma de camundongos. Todos os sete sítios estão localizados *upstream* ao início do sítio de transcrição e, acredita-se que a sua metilação impede a ligação da CTCF (Kanduri et al., 2000). Após a análise do DNA modificado pelo bissulfato de sódio e posterior sequenciamento do DNA da *H19* DMR, foi possível demonstrar que somente o sexto sítio de ligação da proteína CTCF apresentava metilação específica bem como uma correlação entre a presença de metilação deste com o padrão de expressão dos genes *IGF2* e *H19* em câncer de bexiga (Takai et al., 2001). Neste estudo, observou-se a hipometilação do alelo paterno na região de ligação da

proteína CTCF enquanto que o alelo materno esporadicamente estava metilado. Estes dados sugeriram que o sexto sítio de ligação da proteína CTCF é a região reguladora crítica da expressão dos genes *H19* e *IGF2* e que a perda do *imprinting* do *H19* está relacionada com a hipometilação do alelo paterno em tumores de bexiga (Byun et al., 2007).

Como modelo, este mecanismo é muito interessante porque prediz que alterações da metilação de origem parental específica da DMR podem ocorrer em dois sentidos: a perda de metilação do alelo paterno levaria à expressão bialélica do gene *H19*. Por outro lado, a hipermetilação do alelo materno inativaria este provável gene supressor tumoral e conduziria à expressão bialélica do fator de crescimento *IGF2*, simultaneamente. Em especial, esta segunda situação poderia resultar em vantagens de crescimento celular e progressão no processo de carcinogênese.

A perda do *imprinting* (LOI) em 11p15.5 foi descrita em mais de 20 tipos tumorais diferentes (Feinberg, 1999), o que inicialmente sugeriu que esta anormalidade seria um evento somático tumor-específico. A LOI foi observada em cânceres pediátricos e foi associada à progressão tumoral em leucemia mielóide crônica (Randhawa et al., 1998). No entanto, em pacientes com a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (uma patologia que predispõe ao desenvolvimento de tumores pediátricos como tumor de Wilms e rabdomiossarcomas), foi relatada LOI constitucional em fibroblastos de pele, tecido renal normal e em leucócitos de sangue periférico (Weksberg et al., 1993; Joyce et al., 1997). Estes achados sugeriram que a LOI pode preceder o desenvolvimento do câncer e servir como um marcador para avaliação de risco.

Fora do contexto de uma síndrome de predisposição ao câncer, a história familiar permanece o dado mais importante para a identificação da maioria dos

pacientes com risco para desenvolvimento de câncer. Primeiramente, Cui et al. (1998) detectaram a LOI do gene *IGF2* em câncer colorretal esporádico, assim como na mucosa colônica normal pareada e em leucócitos. Baseado nestes dados foi sugerido que a LOI pode ser crucial para se definir um subgrupo de pacientes com câncer ou indivíduos com risco de desenvolvimento de câncer. Cui et al., (2003) demonstraram que a razão de probabilidade ajustada de LOI para o gene *IGF2* em linfócitos era 5,15 para pacientes com uma história familiar positiva para câncer colorretal; 3,46 para pacientes com história pessoal de adenomas de cólon e 21,7 para pacientes com câncer colorretal. Estes resultados sugeriram que a LOI pode ser um marcador de risco individual para câncer.

Kaneda e Feinberg (2005) mostraram que em modelos animais, alterações epigenéticas pré-existentes em células normais aumentam o risco de desenvolvimento de tumores pelo favorecimento da expansão clonal das células da mucosa intestinal e/ou pela modulação do efeito das alterações genéticas subsequentes. Cui (2007) reafirmou o potencial do uso da LOI em 11p15.5 como marcador de risco de câncer para pacientes com história familiar ou pessoal de câncer colo-retal e sugeriu a extensão do estudo deste biomarcador para outros tipos de cânceres.

Expressão e *imprinting* dos genes *H19* e *IGF2* em câncer de bexiga

O gene *H19* é abundantemente expresso nos estágios iniciais da diferenciação embrionária. Recentemente foi demonstrado que esse gene funciona como um transcrito primário de micro RNA (pri-miRNA) em humanos e camundongos (Cai et al., 2007). Durante o desenvolvimento fetal subsequente ele é

seletivamente expresso em certos tecidos, mas sua expressão é praticamente nula na vida pós-natal, assim como na mucosa normal da bexiga em adultos. Devido à re-expressão em carcinomas de epitélio de bexiga, o gene *H19* tem sido considerado por alguns pesquisadores como um oncogene (Ariel et al., 1995). Em adição, o gene *IGF2* é um potente mitógeno e é altamente expresso em muitos tumores (Elkin et al., 1995). A expressão bialélica de *IGF2* é comumente relatada em vários tipos de cânceres devido à perda de *imprinting* (Byun et al., 2007), funcionando assim como um fator de crescimento tumoral.

A expressão do *H19* em tumores adultos foi estudada em amostras de diferentes tecidos tumorais onde o gene é expresso na vida fetal, como mama, cólon, pulmão e bexiga, e embora fosse esperada a ausência de expressão do gene, comparando-se com o que ocorre em tumor de Wilms, foram encontrados altos níveis de expressão do gene. Um dos carcinomas estudados foram os derivados de epitélio transicional da bexiga urinária, que possui abundante expressão de *H19* na vida fetal. Estudos iniciais mostraram que os altos níveis de expressão de *H19* estava relacionado com a perda de *imprinting* do gene, um forte indicativo de que mecanismos epigenéticos podem de fato ter um papel na patogênese do câncer de bexiga (Cooper et al., 1996).

O aumento significativo do transcrito do gene *H19* durante o processo de tumorigênese pode ser resultado da ativação transcricional e/ou do aumento da estabilização do RNA. A perda de *imprinting* do gene permitindo a transcrição dos alelos também pode ser responsável por esse aumento. A expressão bialélica dos genes *H19* e *IGF2* pode ser considerada um indício de transformação celular (Elkin et al., 1995).

Aprofundando a investigação do potencial papel do *imprinting* durante a progressão do tumor de bexiga, foi expandida a análise da expressão do *H19* em tumor de bexiga e demonstrada uma significativa correlação entre expressão do *H19* e avançado grau tumoral. Também foi observado que o *H19* e *IGF2* estão expressos em altos níveis em muitas linhagens celulares de câncer de bexiga (Cooper et al., 1996).

Ensaaios de hibridação *in situ* para a detecção do RNA do gene *H19* em cortes histológicos de amostras fixadas e incluídas em parafina de tumores de bexiga com diferentes graus histológicos (Ariel et al., 1995) revelaram a expressão deste transcrito em tumores graus II e III, carcinomas invasivos e em carcinomas *in situ*. Os autores relataram também altos níveis de expressão deste gene na bexiga urinária fetal, mas ausência de expressão no urotélio normal de adultos e em tumores de baixo-grau, não invasivos. Estes dados sugeriram que a expressão do gene *H19* poderia ser utilizada como marcador tumoral de progressão para fenótipos mais agressivos em carcinomas de bexiga. Estes achados foram corroborados por dois outros estudos: Cooper et al. (1996) demonstraram que este gene se expressa preferencialmente em tumores mais avançados e Ariel et al. (2000) sugeriram o uso do *H19* como um marcador prognóstico para a detecção precoce de recorrência, considerando-se que o tempo de sobrevida livre da doença entre a primeira biópsia e a recorrência foi significativamente menor em pacientes com tumores que apresentavam uma grande fração de células expressando este RNA. Esta hipótese também foi apoiada pela análise da recorrência tumoral em pacientes com tumores de baixo grau. Esteves et al. (2006) relatou uma associação semelhante entre a expressão do gene *H19* em tumores carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço de baixo grau.

Outras pesquisas indicam o uso da expressão aumentada de *H19* como um marcador precoce de recorrência em câncer de bexiga. É possível que esse aumento de expressão seja devido à expressão do alelo metilado paterno do gene *H19* que normalmente não se expressa. Desta forma, a perda da metilação alelo-específica poderia estar envolvida nesse aumento anormal da expressão dos genes *H19* e *IGF2* (Byun et al., 2007).

Poucos relatos prévios investigaram a LOI dos genes *H19* e *IGF2* em carcinomas de bexiga. Elkin et al. (1995) descrevem pioneiramente alterações no padrão de *imprinting* destes genes nestes tumores. De um total de 12 carcinomas estudados, quatro foram informativos para os ensaios de expressão gênica alelo-específica, dois dos quais mostravam expressão bialélica do gene *H19* e um deles a LOI do gene *IGF2*, concomitantemente. Byun et al. (2007), com objetivo de determinar a frequência de LOI detectada pela perda do padrão de expressão alelo-específico (expressão bialélica), compararam os dados de pirosequenciamento alelo-específico para relacionar com as alterações na metilação do DNA em amostras de câncer de bexiga. Foi observado que todos os casos com expressão bialélica estavam associados com decréscimo da metilação do alelo metilado, embora tenham sido observados casos com alteração na metilação não associada à expressão bialélica. Os autores sugeriram que a metilação aberrante do alelo metilado é um evento precoce na LOI e precede a expressão bialélica. Assim, o autor afirma que o estudo da metilação do DNA não pode ser diretamente correlacionado com expressão bialélica destes genes.

Recentemente, o gene *H19* passou a ser proposto como um microRNA, o miR-675, o qual atuaria na regulação da expressão do gene *IGF2* na forma de RNA processado e funcional. Isso poderia implicar que o *H19* teria um papel na regulação

não apenas *in cis*, mas também *in trans*, interferindo na LOI de *IGF2* como miRNA ou siRNA, regulando pós-transcricionalmente ou na tradução do mRNA de *IGF2* (Gabory et al., 2006).

Embora o mecanismo de ação do *H19* seja desconhecido, tem sido demonstrado que vários genes apresentaram expressão alterada na presença de expressão do RNA *H19*. Estes genes foram relacionados com os processos de invasão, migração e angiogênese. Adicionalmente, alguns genes com função de adesão celular apresentam expressão diminuída com o aumento de expressão do gene *H19*, o que levaria à intensificação do poder de invasão do tumor (Ayesh et al., 2002).

miRNA e Câncer

Descobertos recentemente, os miRNAs representam um grupo de pequenos RNAs envolvidos na regulação da expressão gênica (Cowland et al., 2007). Constituem uma família de RNAs regulatórios não codificantes de 19 a 28 nucleotídeos, derivados de RNAs de dupla fita. Pequenos RNAs mediam o silenciamento gênico através de pelo menos quatro diferentes mecanismos: clivagem endonucleolítica do mRNA de mesma origem através do pareamento específico de bases com a molécula alvo; repressão traducional; repressão transcricional através de modificações no DNA e/ou histonas e eliminação do DNA através de modificações de histonas (Kim, 2005).

Os pri-miRNAs (miRNAs primários) não codificadores de proteínas são sintetizados pela RNA polimerase II e processados pós-transcricionalmente pela adição de um 5'cap e uma 3'cauda poli A. O pri-miRNA é processado no núcleo por

um complexo de endonuclease RNase III chamado Drosha e um cofator. Como resultado, é produzida uma estrutura em *hairpin* de 70 nucleotídeos chamado pré-miRNA. Este é transportado para o citoplasma e então processado por outra enzima RNase III, a Dicer. A Dicer corta a porção do *loop* da estrutura em *hairpin*, resultando em uma estrutura dupla fita imperfeita de 22 nucleotídeos. O duplex é desfeito e a fita de miRNA é incorporada ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Finalmente, um complexo efetor ribonucleoprotéico contendo a simples fita de RNA direciona a ligação sequência-específica ao mRNA alvo (Cowland et al., 2007).

O primeiro miRNA identificado, produto do gene *lin-4* e *let-7* em *C. elegans*, tem um importante papel no controle do desenvolvimento (Lu et al., 2005). Embora apenas a função de alguns miRNAs tenha sido caracterizada, tem se mostrado que os miRNAs participam claramente no controle da proliferação e diferenciação celular, resposta ao estresse, imunidade, regulação transcricional e apoptose (Cowland et al., 2007 e Yang et al., 2008). Desta forma, a perda da regulação desses miRNAs pode estar relacionada a diferentes tipos de câncer.

Atualmente, existem evidências de que a expressão de miRNAs está alterada no câncer e estes perfis alterados de expressão podem implicar diretamente no processo carcinogênico. Alguns miRNAs parecem demonstrar expressão aumentada no câncer, agindo como *oncomiRs*, uma vez que são capazes de inibir a expressão de supressores tumorais. A função dos miRNAs no câncer parece ser interrompida pelos mesmos mecanismos que afetam a expressão de genes codificadores de proteínas, como amplificação, translocação, deleção e mutações de sequências de DNA codificadoras de pri-miRNAs, bem como por alterações epigenéticas que alteram a transcrição do miRNA (Cowland et al., 2007).

A primeira ligação direta entre miRNAs e câncer foi feita pelo grupo de Carlo Croce em 2002, que descreveu a perda da expressão do miR-15 e miR-16, mapeados em 13q14, que foram deletados em leucemia linfocítica crônica de células B (Calin et al., 2002). Os modelos *knockout* de miRNAs, assim como estudos de expressão *in vitro*, demonstraram que um único miRNA pode afetar os níveis de expressão de múltiplos mRNAs codificadores de proteínas supressoras tumorais e as derivadas de oncogenes (Rouhi et al., 2008).

Estudos mostraram que o perfil de expressão dos miRNAs são distintos entre o tecido normal e tumoral, e entre diferentes tipos tumorais. Interessantemente, níveis reduzidos de expressão de miRNAs é um achado comum em muitos desses estudos, sugerindo que alguns deles podem agir como um suposto gene supressor tumoral (Lujambio et al., 2007).

Houve muitos progressos na última década no desenvolvimento da taxonomia molecular do câncer. Tornou-se claro que muitos transcritos não codificantes de proteínas são miRNAs que podem ser usado para classificar uma ampla variedade de cânceres humanos (Lu et al., 2005). Muitos miRNAs também podem ser úteis para sub-classificar os tumores originados de um tecido particular. A expressão específica de miRNAs tem sido correlacionada com subtipos histológicos de certos tipos de câncer. Esses miRNAs parecem ter um papel distinto na patogenicidade em diferentes tipos histológicos e pode ser útil no diagnóstico (Tam, 2008).

Fatores epigenéticos podem afetar a expressão de miRNAs. Está bem documentado que genes supressores tumorais podem ser silenciados por alterações na metilação das citosinas localizadas nos dinucleotídeos CpG da região promotora bem como em resíduos específicos de aminoácidos nas histonas (Cowland et al., 2007). Acredita-se que os miRNAs são regulados similarmente aos genes

codificadores de proteínas. Assim, uma forma de inativar os miRNAs supressores tumorais pode ser pela hipermetilação do DNA e/ou pela desacetilação de histonas das regiões promotoras dos genes correspondentes (Cowland et al., 2007).

Níveis menores de expressão de miRNAs em células tumorais têm sido fortemente relacionada à presença de hipermetilação de ilhas CpG nos promotores desses genes (Lujambio et al., 2007). Em muitos cânceres, a hipermetilação de ilhas CpGs em regiões promotoras resulta em um silenciamento transcricional herdável de genes supressores de tumor. No entanto, após exposição da célula a agente desmetilante, sob mutação das DNA metiltransferases ou, após o tratamento com inibidor de desacetilase de histonas, estes podem ser re-expressos (Lee e Dutta, 2008). Cowland et al. (2007), relataram o envolvimento da regulação epigenética dos miRNAs no câncer. Os autores demonstraram que uma proporção pequena de miRNAs, porém significativa, mostra um aumento de expressão após o tratamento com uma combinação de inibidores de HDAC (desacetilases de histonas), ácido fenilbutílico e um agente desmetilante (5-aza-2-desoxicitidina). Em particular, o microRNA miR-127 foi epigeneticamente sub-regulado em várias linhagens derivadas de câncer de bexiga, mama, colo do útero, pâncreas, pulmão e cólon e linfoma de Burkitt. O silenciamento epigenético de um miRNA pode ser tecido-específico, uma vez que sua expressão é característica do tipo de câncer, estágio e outras variáveis clínicas (Lee e Dutta, 2008).

Os alvos da maioria dos pequenos RNAs controlados por *imprinting* são desconhecidos e um importante objetivo para o futuro é encontrar esses alvos e assim a função biológica que esses RNAs exercem (Peters et al., 2008).

II. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal avaliar o padrão de metilação da região diferencialmente metilada no centro regulador do *imprinting* dos genes *IGF2* e *H19* em carcinomas uroteliais.

Objetivos específicos

1. Avaliar o padrão de metilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF na região diferencialmente metilada (*H19*-DMR) em carcinomas uroteliais utilizando-se abordagens qualitativa (*Methylation Specific Restriction Enzyme - Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) e quantitativa (qMSP, *quantitative real time Polymerase Chain Reaction*);
2. Avaliar o padrão de metilação do éxon 1 do gene *H19* por MSP-CTPP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers*), nas mesmas amostras;
3. Correlacionar os achados com parâmetros clínicos e histopatológicos;
4. Avaliar o padrão de metilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR e correlacioná-lo com o padrão de expressão alelo-específico do gene *H19* em duas linhagens celulares de carcinoma de bexiga (5637 e T24) e nas linhagens HCT116 e DKO, derivadas de carcinomas de cólon.

III. MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da amostra

Este estudo incluiu 51 pacientes portadores de tumores uroteliais. As amostras de tecido foram coletadas previamente junto ao Serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú – SP, após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1) e após a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (anexo 2). Foram avaliados 45 pares de amostras de tecidos tumorais e de epitélio morfológicamente normal adjacente ao tumor, confirmado pela análise histológica, seis amostras de tecido tumoral não pareado e uma amostra não contendo área representativa do tumor (ausência de neoplasia). As amostras foram obtidas de acordo com os protocolos preconizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Nacional e com a *Helsinki Declaration* de 1975, revisada em 2000.

Os critérios de inclusão no estudo foram: pacientes submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa junto ao Serviço de Urologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú – SP, com ou sem história prévia de carcinoma urotelial, porém não submetido a tratamento quimio e/ou radioterápico prévio à coleta do tecido tumoral da bexiga urinária. Os prontuários médicos foram examinados para a obtenção de dados demográficos (idade, sexo), informações sobre o estilo de vida (consumo de álcool e tabaco), exposição ocupacional e dados clinicopatológicos.

Para a uniformização dos critérios de diagnóstico e classificação, um fragmento de cada amostra enviada ao laboratório foi incluído em parafina para posterior confecção de lâminas e reavaliação histopatológica, segundo as

determinações da WHO/ISUP (Epstein et al., 1998), por um mesmo médico patologista, o Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

As linhagens 5637 e T24 derivadas de carcinomas uroteliais de bexiga de alto grau não invasivo e invasivo, respectivamente, e as linhagens derivadas de carcinomas de cólon HCT116 e DKO, que são células HCT116 duplo *knockout* para as DNA metiltransferases 1 e 3b (DNMT1 e DNMT3b) (Han et al., 2007) também foram incluídas no presente estudo. As linhagens 5637 e T24 foram obtidas junto ao Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células HCT116 e DKO foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Lígia da Veiga Pereira, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo (USP).

O DNA tumoral obtido foi submetido a três abordagens diferentes visando à avaliação do padrão de metilação do DNA do gene *H19*:

1. Detecção do padrão de metilação alelo-específico da DMR baseada em MSRE (*Methylation Specific Restriction Enzyme*) seguida da análise de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*).
2. Detecção do padrão de metilação alelo específico baseada em MSP-CTPP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers*).
3. Quantificação da metilação do DNA no sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR por qMSP (*quantitative Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*).

As linhagens foram submetidas à análise do padrão de metilação alelo-específico da DMR baseada em MSRE-PCR-RFLP, qMSP e do padrão de expressão alelo-específico, cujo protocolo encontra-se descrito a seguir (item 4: Análise do padrão de expressão alelo-específico do gene *H19*).

Cultura das linhagens celulares

As células permaneceram armazenadas (alíquotas de 1×10^6 células/mL) em solução de congelamento contendo DMSO a 10%, em nitrogênio líquido. No momento do uso, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamadas, em frascos de cultura de 25 cm^3 . Nas culturas, incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , utilizou-se os meios de cultivo DMEM+F10 (Gibco) e RPMI (Gibco), respectivamente para as linhagens 5637 e T24 e o meio McCoy's 5A para as linhagens HCT116 e DKO, todos suplementados com 10% de soro fetal bovino (LGC) 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 2mL da solução de 0,25% tripsina/EDTA 1X (*Invitrogen*), durante cinco minutos ou até o desprendimento das células, quando, então, foram adicionados 2mL de meio completo para a inibição da tripsina. Os experimentos foram conduzidos com as células em crescimento exponencial, após o terceiro subcultivo. Um total de 1×10^6 células foi subcultivado em frascos de 25 cm^2 . Estas células foram submetidas ou não ao tratamento contínuo com o agente desmetilante 5 aza 2'-desoxicitidina (5Aza) (*Sigma*) na concentração de $1 \mu\text{M}$ durante 4 dias. A 5Aza foi diluída em DMSO a uma

concentração de 1mM. Durante o período do tratamento, o meio de cultura foi renovado a cada 24 horas, sendo a droga adicionada ao meio imediatamente antes do uso. Para cada linhagem, um frasco controle contendo apenas o diluente foi submetido ao mesmo protocolo. Decorrido este período, as células foram recuperadas durante 48 horas de crescimento em meio completo sem a droga. Cada tratamento foi realizado em duplicada, sendo um frasco destinado para a extração de DNA e o outro para a extração de RNA.

Obtenção do DNA genômico

Áreas representativas do tecido tumoral a fresco foram fragmentadas com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas estéreis, transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5mL e submetidas à desagregação enzimática pela adição de 50 μ L de proteinase K na concentração final de 100 g/mL, 450 μ L de tampão de extração (100mM de Tris pH 8,0; 50mM de EDTA e 500mM de NaCl) e 25 μ L de SDS a 20%. Para a extração do DNA das linhagens celulares, o *pellet* foi ressuspensionado em 500 μ L de tampão de extração, 20 μ L de proteinase K e 25 μ L de SDS a 20%. Após homogeneização, os microtubos foram incubados a 37°C, *overnight*.

Após a digestão protéica, foi realizada a extração padrão com solventes orgânicos. Foi adicionado 0,5mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguido de homogeneização por um minuto e centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e a etapa anterior foi repetida uma vez. O sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e a este foi adicionado 0,5mL de clorofórmio. Novamente foi feita a homogeneização por 1 minuto e centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos. Em seguida, o

sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, sendo o volume da amostra estimado visualmente. O DNA foi precipitado adicionando-se aproximadamente 10% deste volume de acetato de amônio 7,5M e dois a três volumes de etanol absoluto gelado. O microtubo foi mantido à -20°C *overnight*. Em seguida, o material foi centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos e depois de descartado o sobrenadante, o *pellet* de DNA foi lavado com etanol 70%, secado a temperatura ambiente e ressuspendido em 80 μL de água ultra-pura estéril, sendo posteriormente armazenado em *freezer* -20°C . A quantidade e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas através da leitura em espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000*.

Todos os ensaios laboratoriais foram baseados na Reação em Cadeia da Polimerase. Na tabela 1 encontram-se os oligonucleotídeos iniciadores utilizados em cada abordagem metodológica do presente estudo:

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no presente estudo.

Tipo de análise	Sequência dos oligonucleotídeos	Referência
MSRE-PCR-RFLP	Primeira amplificação II: 5'-CAATGAGGTGTCCCAGTTCCA-3' III: 5'-CACATAAGTAGGCGTGA-3' <i>Nested PCR</i> IIa: 5'-CCTAGTGTGAAACCCTTCTCG-3' IIIb 5'-TGTGGATAATGCCCGACCTGA-3'	Esteves et al., 2006
MSP-CTPP*	Genotipagem – PCR <i>multiplex</i> <i>H19</i> -GF: 5'-TCGGGGAGTTGCAGCAGGACG-3' <i>H19</i> -GR: 5'-GAGCGGTGAGGGCATAACAGC G -3' <i>H19</i> -AF: 5'-GAGCAAGAGGGCAGGGAGGGA-3' <i>H19</i> -AR: 5'-CCGCTTCGCCCTCCTGGTGA I -3' MSP <i>H19</i> -G-MF: 5'-TTCGGGGAGTTGTAGTAGGACG-3' <i>H19</i> -G-MR: 5'-CCCTAAACCGCAATACCTCG-3' <i>H19</i> -A-MF: 5'-AGTTTCGAGGGTTGGAGAGC-3' <i>H19</i> -A-MR: 5'-CCGCTTCGCCCTCCTAATAAT-3'	Sasamoto et al., 2004
qMSP**	Sequência do normalizador (gene <i>ACTB</i>)* F: 5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3' R: 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3' Alelo metilado F: 5'-CGCGGCGGTAGTGTAGGTT-3' R: 5'-CCCTACGACGCGTAACTTAAATAAC-3' Alelo não metilado F: 5'-TG TAGTTGTGGAATTGGAAGTGGTT-3' R: 5'-CCCAAACATTTCCACAAACAAA-3'	Hoque et al., 2006
RT-PCR alelo-específica	Gene <i>H19</i> H1: 5'-TACAACCACTGCACTACCTG-3' H3: 5'-TGAATGCTTGAAGGCGTCT-3' Gene <i>GAPDH</i> * 5'-CGTCTTACCACCATGGAGA-3' 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3'	Rainer et al., 1993 Lassner, 1995

MSRE-PCR, *Methylation Specific Restriction Enzyme* seguida da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*); MSP-CTPP, *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers*; qMSP, *quantitative real time Polymerase Chain Reaction*; RT-PCR – *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*; (*) *Guidelines for Human Gene Nomenclature*: *ACTB* - *actin, beta*; *GAPDH* - *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. * - as bases realçadas em negrito discriminam os alelos do SNP. ** os primers para região metilada e não metilada foram desenhados no laboratório para esse experimento.

III.1. Detecção do padrão de metilação alelo-específico da DMR baseada em MSRE (*Methylation Specific Restriction Enzyme*) seguida da análise de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Esta análise baseia-se no uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação do DNA (*HpaII*), que não são capazes de clivá-lo quando citosinas CpGs contidas no seu sítio de reconhecimento estão metiladas (C^mCGG), e sua isosquizômera (*MspI*), que reconhece o mesmo sítio e cliva o DNA independente da presença de metilação (CCGG ou C^mCGG). Após a amplificação pela PCR, desvios do *imprinting* da DMR podem ser detectados em indivíduos heterozigotos para um marcador neutro, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) detectado pela enzima de restrição *HhaI*. Este polimorfismo possui o identificador rs10732516 no *Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP)* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Esta análise foi realizada conforme um estudo prévio do nosso grupo (Esteves et al., 2006). Inicialmente, o RFLP *HhaI* foi genotipado utilizando-se o DNA obtido do tecido normal adjacente ao tumor ou, na ausência deste, o próprio DNA tumoral. Uma vez identificado os casos informativos (heterozigotos para o RFLP), a análise foi repetida no DNA tumoral para a verificação da retenção de ambos os alelos na amostra tumoral (ausência de perda de heterozigose ou LOH). Em seguida, o ensaio foi repetido nas amostras de DNA normal e tumoral previamente digerido com a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII*. Resumidamente, 100ng de DNA de tecido normal e tumoral de pacientes informativos foram tratados com 100U da endonuclease de restrição *HpaII* a 37°C *overnight*. Em seguida, os

fragmentos foram submetidos à amplificação pela PCR com os iniciadores II e III (tabela 1) por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, pareamento dos *primers* a 59°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Um microlitro do produto desta reação foi subsequentemente utilizado como molde em uma *nested PCR*, utilizando-se os iniciadores IIa e IIIb e as mesmas condições de desnaturação, pareamento e extensão (figura 1)

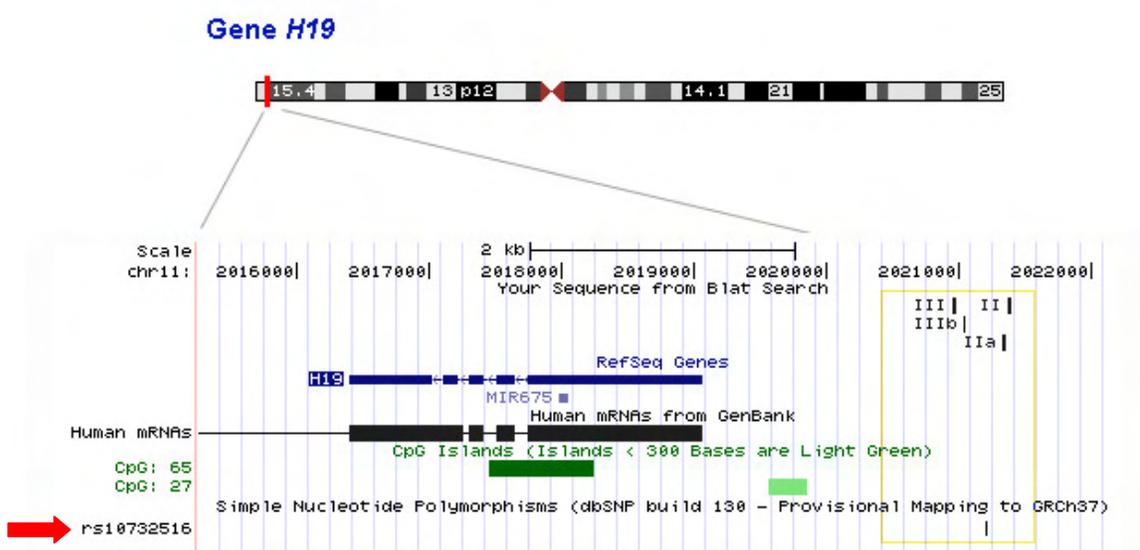


Figura 1. Dados de mapeamento dos *primers* (retângulo amarelo) utilizados no ensaio de MSRE-PCR-RFLP para a análise do padrão de metilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR, localizada a ~2Kb *upstream* ao gene *H19*. Os *primers* externos III e II geram um produto de 436 pb e os internos IIa e IIIb, de 323pb. A transição A>G detectada pela enzima de restrição *HhaI* (SNP rs10732516) está contida nestes fragmentos (seta vermelha). [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19)*, disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em março/2010)

As reações foram realizadas num volume final de 25µL contendo dNTPs (125mM cada), *primers* (0.2 mM cada), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl e 1U de Taq DNA polimerase. Após a verificação do sucesso da amplificação e da especificidade da reação pela eletroforese em gel de

poliacrilamida neutro a 6% e coloração por nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994), os produtos desta PCR foram submetidos à ação da enzima *HhaI* (15 unidades à 37°C *overnight*). A ausência do sítio polimórfico resulta em uma banda de 323pb (alelo a) enquanto que a sua presença resulta em dois fragmentos de 151pb e 172pb (alelo b). Para um padrão normal de metilação da DMR espera-se a amplificação mutuamente exclusiva dos alelos a e b; no entanto, quando a presença dos dois alelos é detectada, há indicação de hipermetilação da DMR.

Como controle, utilizou-se a digestão de 100ng de DNA com 100U da enzima de restrição *MspI*, seguindo-se as mesmas etapas descritas anteriormente. Esta isosquizômera da *HpaII* não é sensível à metilação dos resíduos de citosina em seu sítio de reconhecimento. Após este tratamento, espera-se observar a ausência de amplificação dos fragmentos. A detecção de um produto de amplificação pela PCR indica digestão enzimática parcial, mas não a metilação da região em estudo (falso positivo).

Para produção de um controle negativo uma amostra heterozigota para o RFLP-*HhaI* foi amplificada utilizando-se os *primers* II e III. Um microlitro do produto da reação foi submetido à nova amplificação pela PCR com os mesmos *primers* sob as mesmas condições de amplificação. Em seguida, 1,0 µL do produto da segunda PCR foi submetido à *nested* PCR utilizando o par de *primers* internos IIa e IIIb. Finalmente, o produto foi dosado em espectrofotômetro e 100ng foram digeridos com 100U da enzima de restrição sensível à metilação *HpaII*, amplificado novamente com o mesmo par de *primers* internos e analisado após eletroforese. Conforme esperado, todo produto foi digerido resultado da digestão total de todo produto “desmetilado”. Paralelamente, foi realizada a digestão com *MspI* como forma

de controle da reação, uma vez que a enzima é indiferente à metilação dos sítios CCGG.

Para controle positivo, uma amostra de DNA sabidamente heterozigota para o RFLP *HhaI* foi submetida a hipermetilação em reação com *SssI* (*CpG*) *Methylase* (*New England Biolabs*), em que 10µg de DNA foram incubados a 37°C com 10U da enzima por 12 horas e desnaturada em seguida por 20 minutos a 65°C. O produto foi digerido com *HpaII* e *MspI* para a confirmação da perda do padrão de metilação alelo-específico (perda do estado hemi-metilado).

III.2. Detecção do padrão de metilação alelo-específico baseada em MSP-CTPP (Methylation Specific Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers)

Esta análise foi proposta por Sasamoto et al. (2004). Inicialmente, o DNA do tecido normal adjacente ao tumor foi submetido à amplificação pela PCR para a genotipagem de um polimorfismo de base única, o SNP identificado pelo rs2067051 no dbSNP, segundo abordagem descrita por Hamajima (2001). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 L contendo 100ng de DNA genômico, 10pmol de cada *primer*, 200 M de cada dNTP, 15 mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de KCl, 0.65 U de *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*). A reação multiplex foi conduzida com os *primers* *H19-GF*, *H19-GR*, *H19-AF* e *H19-AR* por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, pareamento dos *primers* a 64°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto. Espera-se a amplificação de um produto constante de 426pb (*primer set* *H19-GR* e *H19-AF*), e a presença de uma banda de 189pb para o alelo G (*primer set* *H19-GF* e *H19-GR*) e/ou de 277pb

para o alelo A (*primer set* H19-AR e H19-AF) após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata. Amostras heterozigotas para esta transição G>A foram consideradas informativas para a análise do padrão de metilação alelo-específico (Figura 2).

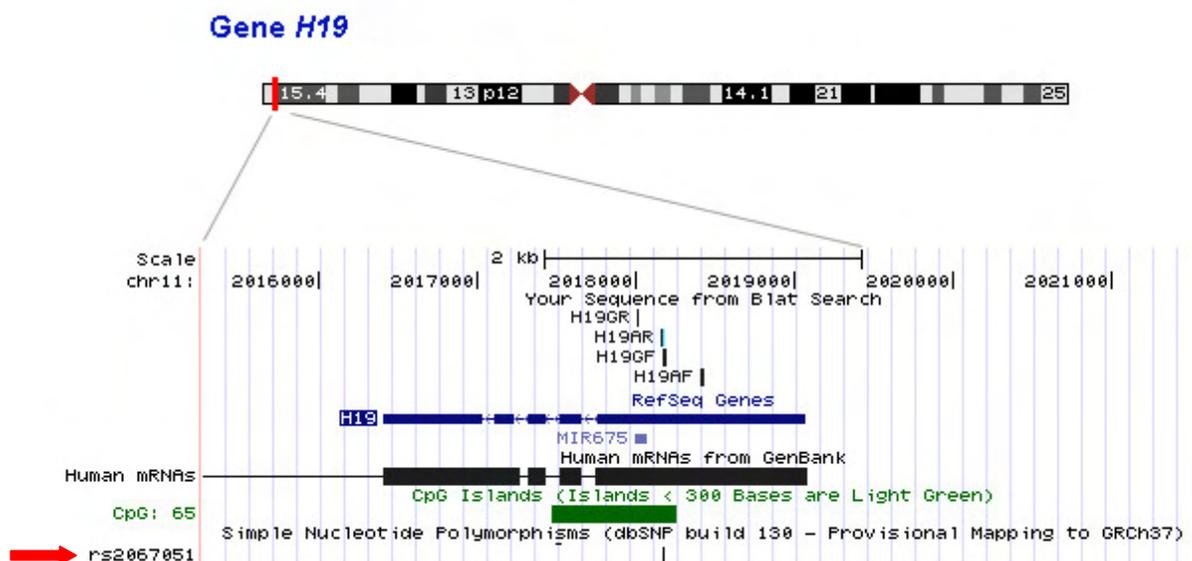


Figura 2. Dados de mapeamento dos *primers* para a genotipagem da transição A>G utilizada como marcador para diferenciar os alelos na análise de MSP-CTTP. Estes oligonucleotídeos amplificam uma região do éxon 1 do gene *H19*, que se sobrepõe ao início da ilha CpG 65, que contém o miR675. A transição A>G detectada por uma abordagem de PCR alelo-específica, determinada pela base nitrogenada na posição 3' do *primer* H19-GF (alelo G) ou 3' do *primer* H19-AR (alelo A), que coincide com o polimorfismo rs2067051 (seta vermelha).

[*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway*, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19), disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em março/2010)

Para a padronização da genotipagem por CTPP, utilizou-se o DNA extraído do sangue periférico de indivíduos voluntários saudáveis. Após a amplificação por PCR com os *primers* externos H19-GR e H19-AF, o produto de 426pb foi purificado e sequenciado. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1* (Applied Biosystems)

e cada um dos oligonucleotídeos iniciadores do par, em reações isoladas. As amostras foram carregadas em um sequenciador automatizado de DNA ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os dados do sequenciamento foram avaliados quanto à sua qualidade no *software* Phred/Phrap (<http://www.phrap.org>) (Ewing e Green, 1998).

Ao contrário da abordagem de MSRE-PCR-RFLP que se baseia no uso de enzima de restrição, a MSP-CTPP discrimina os padrões de metilação do DNA pelo tratamento com bissulfito de sódio (Figura 3). Para a modificação do DNA pelo bissulfito de sódio, foi utilizado um protocolo padronizado em nosso laboratório, segundo Paulin et al. (1998), com modificações: 2µg de DNA genômico foi desnaturado em um volume final de 18µL pela adição de 2µL de uma solução de NaOH 3M a 40°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionadas solução de uréia-bissulfito (6,24M de uréia/2M de metabissulfito de sódio) e 6µL de solução de hidroquinona a 10mM. Os tubos foram mantidos em termociclador e submetidos a 20 ciclos de 55°C durante 15 minutos, separados por um período de desnaturação a 95°C por 30 segundos. O DNA tratado foi purificado com o *kit Wizard DNA Clean-UP System (Promega)*, segundo as recomendações do fornecedor. A modificação foi concluída pela adição de 5,0 L de NaOH 3M a temperatura ambiente durante 15 minutos. A precipitação foi realizada pela adição de 30 L de acetato de amônio 5M, 350 L de etanol 100% e 1,0 L de glicogênio (20 g/ L) (*Invitrogen*). O DNA modificado foi ressuspendido em 30 L de água ultra-pura estéril e armazenado a – 80°C para posterior amplificação pela PCR. Alternativamente, o DNA foi modificado utilizando-se o *kit Epitect Bisulfite kit (Qiagen)*, segundo as recomendações do fornecedor.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 L contendo 5 L de DNA modificado pelo bissulfito de sódio, 15 mM de Tris-HCl pH

8.0, 50 mM KCl, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5mM de MgCl₂, 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 0.65U de *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*). A reação multiplex foi conduzida com os *primers*: *H19-G-MF*, *H19-G-MR*, *H19-A-MF* e *H19-A-MR* por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, pareamento dos *primers* a 59°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Espera-se a amplificação de um produto constante de 171pb (*primer set* H19-GMR e H19-A-MF), e a presença de uma banda de 135pb para o alelo G (*primer set* H19-G-MF e H19-G-MR) e/ou de 99pb para o alelo A (*primer set* H19-A-MR e H19-A-MF) (Figura 3). Um resultado de MSP-CTPP pode ser interpretado como metilação bialélica (3 bandas) ou monoalélica (2 bandas) após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata.

Para a obtenção de um controle positivo para este ensaio, 1 g de DNA genômico de uma amostra heterozigota foi tratada com metilase *SssI*, conforme descrito acima.

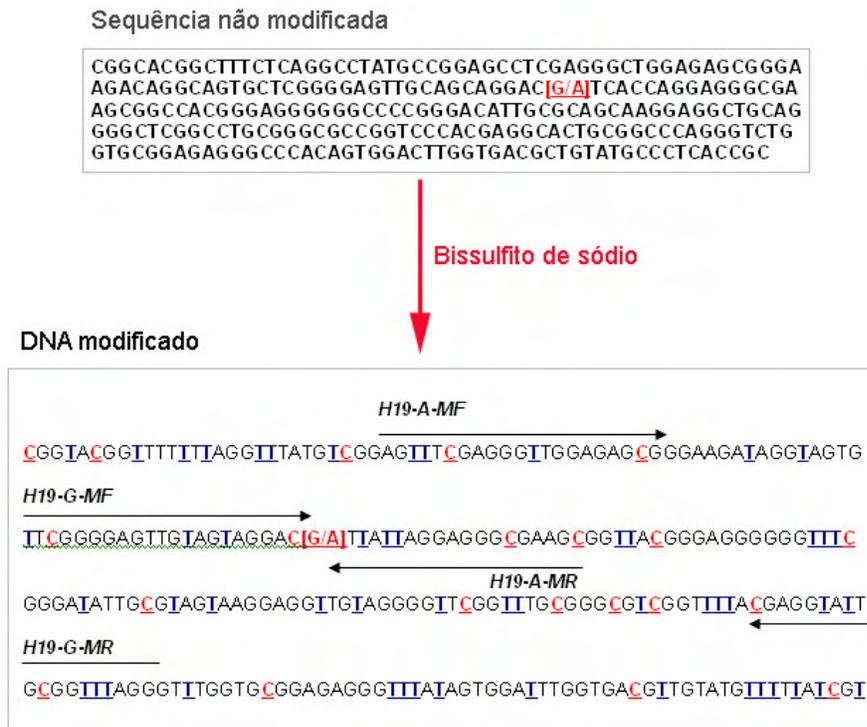


Figura 3. Estratégia de MSP-CTPP. Após a modificação pelo bissulfito de sódio que discrimina as citosinas metiladas (C) das não metiladas (T), os alelos G e A são detectados com dois pares de *primers* (setas pretas) em uma reação de PCR *multiplex* (pares H19-A-MF/H19-A-MR para o alelo A e H19-G-MF/H19-G-MR para o alelo G).

III.3. Quantificação da metilação do DNA no sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR por qMSP (*quantitative Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*).

Avaliação preliminar *in silico* e seleção de oligonucleotídeos para a amplificação dos sítios de ligação do fator CTCF na DMR.

Inicialmente, a sequência da DMR do gene *H19* foi recuperada em bancos de dados públicos, estendo-se até 5000pb *upstream* ao sítio de início da

transcrição (<http://genome.ucsc.edu>). Em seguida, famílias de DNA repetitivo como as seqüências *Alu* foram mascaradas a partir da submissão da seqüência em estudo na ferramenta *Grail Experimental Gene Discovery Suite* (<http://compbio.ornl.gov/Grail-1.3>). Para a seleção dos oligonucleotídeos iniciadores, inicialmente a região alvo da DMR contendo o sexto sítio de ligação do fator CTCF foi submetida a uma simulação da modificação pelo bissulfito de sódio no software *Methyl Primer Express* versão 1.0 (*Applied Biosystems*). Fragmentos representativos de alelos metilados e não metilados foram então submetidos ao software *Primer Express* 3.0 para o desenho de *primers* específicos (tabela 1). Foram considerados critérios como o maior número possível de dinucleotídeos CpGs consecutivos (pelo menos dois) para garantir a especificidade e condições uniformes de amplificação. Foram definidos *primers* para as condições metilada (M) e não-metilada (U) (Figura 4).



Figura 4. **A.** Sequência da DMR flanqueando o sexto sítio de ligação do fator CTCF. Este fragmento se sobrepõe ao fragmento analisado pela estratégia de MSRE-PCR-RFLP, onde os sítios três sítios *Hpa*II e o sítio polimórfico detectado pela enzima *Hha*I (vermelho) estão destacados pelos retângulos. **B e C.** A região de pareamento dos *primers* para a detecção dos alelos metilados e não metilados, respectivamente, encontra-se destacada em negrito e sublinhada e os dinucleotídeos interrogados no ensaio de qMSP realçados pelos quadrados.

Análise de quantificação da metilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR

Utilizou-se uma estratégia baseada em qMSP (*real time quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). As reações de amplificação foram conduzidas no aparelho *StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, que constitui uma plataforma integrada para a detecção, quantificação e monitoramento em tempo real de produtos amplificados a partir da PCR. Os dados foram analisados pelo *StepOne™ Software v2.1* e plotados em um gráfico da intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Para a detecção da fluorescência foi utilizado o corante *SYBR Green* que apresenta alta especificidade de ligação à dupla fita de DNA. Durante a polimerização dos fragmentos de ácidos nucleicos, um grande número de moléculas do corante se liga ao DNA dupla fita recém sintetizado e o aumento na intensidade de fluorescência foi monitorado em tempo real (Simpson et al., 2000). Neste experimento também foi utilizado um corante fluorescente (*ROX™*) que funciona como uma referência passiva, ou seja, a emissão de fluorescência por ele é constante, o que evita alterações na quantificação do produto devido a uma possível evaporação da amostra.

As amostras de DNA modificadas pelo bissulfito de sódio utilizando-se o *Epitect Bisulfite kit (Qiagen)*, segundo as recomendações do fornecedor, foram utilizadas como molde na reação de PCR. As reações foram realizadas em placas de 48 poços, em triplicatas de cada amostra, num volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L do reagente *SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 200nM de cada iniciador, e 1 μ L da amostra de DNA modificado. A amplificação das sequências alvo

e controle (normalizador) de cada amostra foi detectada na mesma placa de reação. As condições de amplificação para todos os iniciadores foram: um ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final de cada reação, a curva de dissociação para cada *amplicon* foi utilizada para a avaliação da especificidade do produto amplificado. Os dados de fluorescência capturados na fase de extensão de cada ciclo da PCR foram plotados em função do número de ciclos pelo *StepOne Software v2.1*. O programa primeiramente determina o nível basal de fluorescência e o *threshold* na fase exponencial da curva de amplificação. O ponto em que ocorre a intersecção do *threshold* com a curva de amplificação é denominado de Ct (*cycle threshold*) correspondendo ao ciclo no qual o sinal fluorescente excede o sinal de *background* da reação. Todas as amostras em uma placa de reação foram comparadas no mesmo *threshold*, porém o Ct variou de acordo com o ciclo em que a curva de amplificação cruza este limite. Desta forma, cada amostra apresenta um valor de Ct específico que correlaciona-se com a quantidade de DNA na amostra.

Determinação de Curvas-Padrão

O ensaio de quantificação relativa é utilizado para analisar alterações nas quantidades de ácidos nucléicos amplificados em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência (controle ou calibrador). A quantificação relativa pode ser realizada através de dois métodos: método da curva padrão relativa e método Ct comparativo (ou $\Delta\Delta CT$). No método da curva padrão é preciso realizar, a cada análise, uma diluição em série para que seja possível a realização da quantificação. Em relação do método CT comparativo, um experimento de validação deve ser

realizado para mostrar se as eficiências das amplificações do alvo e do controle endógeno (normalizador) são aproximadamente iguais. A vantagem de utilizar esse método é que não é preciso usar uma curva padrão. Isso aumenta o rendimento e diminui os custos, já que não é necessária a utilização de mais poços e reagentes para as amostras da curva padrão. Isso também elimina a possibilidade de qualquer erro de diluição das amostras durante a montagem da curva padrão. O resultado final é obtido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Na determinação das curvas-padrão para a amplificação de alelos metilados, não metilados do gene *H19* e do controle *ACTB*, inicialmente foi utilizado um *pool* de amostras de DNA normal obtido do sangue periférico de indivíduos saudáveis (DNA referência). Diluições seriadas do estoque de DNA modificado foram utilizadas para estabelecer cada curva padrão. As reações foram realizadas num volume final de 10 μ L, em triplicatas, utilizando 200nM para os *primers* *ACTB* (normalizador), U (alelo não metilado) e M (alelo metilado). Para os cálculos, os valores de Ct das diluições seriadas da amostra de DNA modificada e amplificadas com os *primers* *ACTB*, *H19-M* ou *H19-U* foram plotados contra o logaritmo negativo do fator de diluição (curva padrão). Espera-se que as reações apresentem um coeficiente de correlação (R^2) maior do que 0,99 e um *slope* próximo de -3.33, indicando um aumento exponencial de duas vezes no produto da PCR por ciclo na fase linear da reação.

Para a padronização do ensaio de qMSP, inicialmente foi utilizado o método da curva padrão relativa para quantificação dos alelos metilados e não metilados nas amostras das linhagens celulares T24, 5637, HCT116, DKO, e controle não metilado produzido no laboratório. O controle hipermetilado foi representado pelo DNA HeLa hipermetilado disponível comercialmente (*New England BioLabs*). Como controle hipometilado foi utilizado o DNA obtido do sangue periférico de voluntários

amplificado por dois ciclos com o *kit GenomiPhi Whole DNA amplification* (Amersham Biosciences), seguido da purificação com o *QiAquick.PCR Purification Kit* (Qiagen).

Os valores do log da quantidade de cada amostra foram calculados usando uma função da respectiva curva padrão. A quantidade de DNA na reação foi corrigida com os valores do gene *ACTB* (razão *H19M* ou *U/ACTB*, indicando o *input* de DNA modificado pelo bissulfito), representado por uma região que não apresenta dinucleotídeos CpG. Os valores de *H19-M* e *H19-U* corrigidos foram definidos relativos à soma da quantidade de alelos metilados e não metilados ($H19M + H19U = 100\%$) para a obtenção dos valores de PMR e PUR (*percentage of methylated reference* e *percentage of unmethylated reference*, respectivamente) (Hattermann et al., 2008).

A partir deste ensaio piloto, as amostras de DNA hipermetilada HeLa e das células DKO foram selecionadas para a construção de novas curvas padrão visando a quantificação de alelos *H19* metilados e não metilados, respectivamente, nas amostras pelo método do Ct comparativo. Para esta abordagem ser válida, a eficiência de amplificação do alvo (*H19M* ou *H19U*) e do controle devem ser aproximadamente iguais. O valor de Ct do controle *ACTB* foi subtraído do valor de Ct da amostra calibradora (DNA de referência ou DNA normal adjacente ao tumor) (ΔCt). Para cada amostra tumoral, este valor foi subtraído do valor resultante da subtração do Ct do alvo menos o valor do controle ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumoral} - \Delta Ct \text{ da referência}$) e utilizado na equação $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ para a determinação da quantidade de alelos metilados ou não metilados em relação ao tecido normal (Kristensen et al., 2008).

III.4. Análise do padrão de expressão alelo-específico do gene *H19*

Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA utilizou-se o *RNeasy mini kit (Qiagen)*, segundo as recomendações do fornecedor. A concentração do RNA total foi obtida pela dosagem no espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000*.

Uma alíquota contendo 1µg de RNA total foi submetida à purificação com DNase I (*amplification grade - Invitrogen*), em uma reação contendo 1 unidade de DNase I, 20mM de Tris-HCl pH 8,4; 50mM de KCl e 2mM de MgCl₂, num volume final de 10µL, a temperatura ambiente durante 15 minutos. A ação da enzima foi interrompida pela adição de 1µL de EDTA 25mM e aquecimento a 65°C durante 15 minutos. Todo o conteúdo foi diretamente utilizado na síntese de cDNA pelo uso do *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*. A reação foi conduzida num volume final de 20µL, contendo 1X RT-*buffer*, 4mM de dNTPs, *random primers*, 40 unidades de inibidor de ribonuclease *RNaseOut (Invitrogen)* e 50U de *MultiScribe Reverse Transcriptase*. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador PTC-200 (*MJ Research*), sob as seguintes condições: uma etapa de 25°C durante 10 minutos seguida de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C para interromper a reação. O produto obtido foi usado diretamente na reação em cadeia da polimerase (PCR) ou conservado a -80°C.

Avaliação da qualidade do cDNA obtido

Para avaliar a qualidade do cDNA sintetizado, um fragmento de 300pb do gene *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foi amplificado pela PCR. Cada reação foi realizada em volume final de 25µL contendo 0,25µM de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂, 1U da enzima *AmpliTaq Gold DNA polymerase* (*Applied Biosystems*). O conjunto de *primers* utilizado encontra-se descrito na tabela 1.

Análise de expressão alelo-específica

A análise de expressão alelo-específica foi conduzida pela comparação da genotipagem do RFLP-*RsaI* (RFLP que identifica o SNP rs2839704) localizado no éxon 5 do gene *H19* (Figura 5), nas amostras pareadas de DNA genômico e cDNA de cada linhagem celular. As reações de PCR foram conduzidas em um volume final de 25µL contendo 0,25µM dos *primers* H1 e H3, 200µM de cada dNTP, 20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl, 1,0mM de MgCl₂, 1U da enzima *AmpliTaq Gold DNA polymerase* (*Applied Biosystems*). As condições de amplificação foram: 35 ciclos a 94°C por 1 min, 65°C por 3 min, e 72°C por 4 min, após uma etapa inicial de desnaturação a 94°C durante 10 minutos.

Espera-se um produto de 655pb para o DNA genômico e de 575pb para o cDNA. Após a clivagem destes produtos com a enzima de restrição *RsaI* um fragmento de 655bp para o DNA e 575bp para o cDNA (ausência do sítio de restrição) ou fragmentos de 485bp e 170 bp para o DNA e 405bp e 170bp para o cDNA (presença do sítio de restrição) foram denominados alelos a e b,

respectivamente. No caso de manutenção do *imprinting*, espera-se a detecção da expressão de apenas um alelo em amostras heterozigotas para este RFLP.

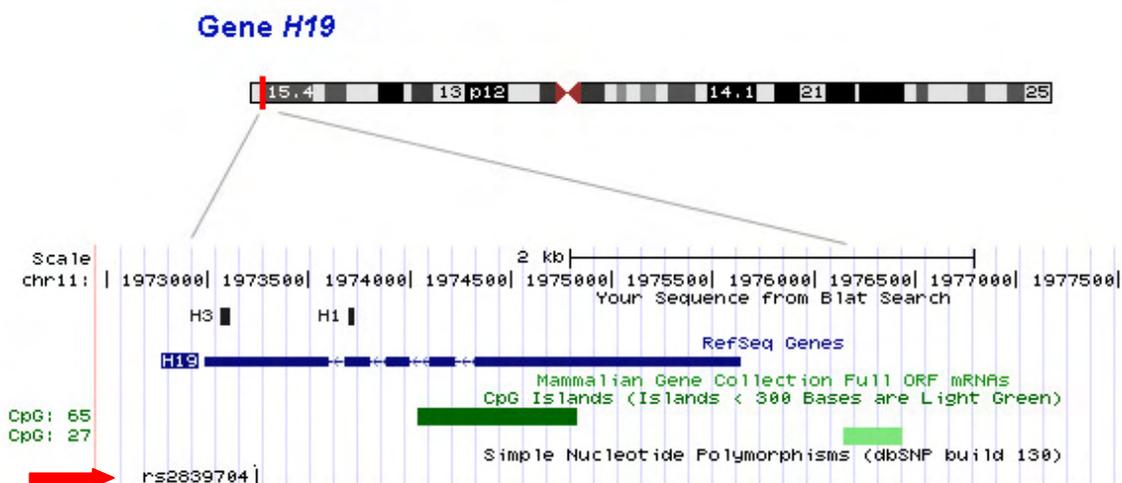


Figura 5. Dados de mapeamento dos *primers* para a genotipagem da transição G>A utilizada como marcador para diferenciar os alelos na análise de expressão alelo-específica. Os oligonucleotídeos H1 e H3 estão localizados nos éxons 4 e 5, o que permite diferenciar a produto amplificado a partir do DNA genômico (655pb) e do cDNA (575pb). O RFLP-*RsaI* é um marcador neutro para diferenciar os alelos e coincide com o polimorfismo rs2839704 (seta vermelha) localizado no éxon 5. [*Human (Homo sapiens) Genome Browser Gateway, assembly: Feb.2009 (GRCh37/hg19)*, disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, acesso em março/2010)].

III.5 . Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa de análise Graphpad Prism versão 5.0. Foram utilizados testes não paramétricos para a comparação dos valores de metilação do DNA determinados pela qMSP. O teste de Mann-Whitney foi aplicado quando duas categorias foram avaliadas (comparação da quantidade de metilação do DNA entre os tecidos normais e tumorais e entre as variáveis clínico-patológicas), tendo como valores críticos $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

O presente estudo incluiu 52 amostras de tecido tumoral provenientes de 51 pacientes portadores de carcinomas uroteliais. As amostras de tecido de bexiga foram coletadas a fresco para extração de DNA e uma parte deste foi submetida à reavaliação histopatológica pelo mesmo médico patologista. Das 52 amostras coletadas, 45 possuíam tecido pareado adjacente ao tumor, morfologicamente normal, confirmado pela análise histológica, seis correspondiam somente à amostra de tecido tumoral e uma amostra não possuía área representativa do tumor no fragmento enviado ao laboratório (ausência de neoplasia) (caso 13), porém de um paciente portador de carcinoma de baixo grau não invasivo. As amostras 029 e 046 foram coletadas do mesmo paciente após um intervalo de três meses (em ambas, o laudo diagnóstico foi de carcinoma papilífero de alto grau invasivo). Quarenta e nove amostras foram classificadas como carcinomas de células transicionais (TCC), três como carcinomas espinocelulares.

As amostras foram classificadas quanto ao padrão de crescimento (papilífero ou não papilífero), grau de malignidade (baixo ou alto) e quanto à presença de invasão (invasivo ou não invasivo), segundo distribuição da tabela 2.

Tabela 2. Características demográficas e clínico-patológicas dos casos de carcinomas uroteliais estudados.

Variável (número de casos)		Número de casos (%)
Idade (50)	67,5±10,01	
Sexo (51)	Masculino	41 (80%)
	Feminino	10 (20%)
Padrão de crescimento (48)*	Papilífero	32 (66,7%)
	Não papilífero	16 (33,3%)
Grau (48)*	Baixo	22 (45,8%)
	Alto	25 (52,1%)
	Alto e Baixo	1 (2,1%)
Invasão (47)*	Invasivo	18 (38,3%)
	Não Invasivo	29 (61,7%)
Outros (3)		
	Carcinomas espinocelulares	

*- o caso 13 foi incluído pois refere-se a um paciente portador de carcinoma de baixo grau não invasivo.

Este conjunto foi submetido à análise do padrão de metilação alelo-específico por duas abordagens distintas: MSRE-PCR-RFLP e MSP-CTPP (tabela 3).

Na primeira abordagem, inicialmente o RFLP *HhaI* foi genotipado em todas as amostras de DNA, tanto normal quanto tumoral. Foram detectados 28 pacientes heterozigotos (casos informativos), 14 homozigotos para a ausência do sítio polimórfico e nove para a presença do sítio. As frequências do alelo a (ausência do

sítio polimórfico) e **b** (presença do sítio polimórfico) foram 0,55 e 0,45, respectivamente.

Tabela 3. Análise do padrão de metilação alelo-específico em carcinomas uroteliais.

Amostra	Paciente	Idade	Sexo	Recorrência	Tecido Normal *	Análise de metilação alelo específica				
						MSRE-PCR-RFLP		MSP-CTPP		
						RFLP <i>HhaI</i>	Metilação alelo específica	Genotipagem A/G	Metilação Tecido tumoral	Metilação Tecido normal
TCC papilífero de baixo grau não invasivo										
010	SC	70	M	N	+	ab	a	AG	NA	NA
011	MA	85	M	S	+	ab	b	GG	NI	-
012	JP	65	M	S	+	ab	a	AG	Metilação bialélica	Metilação bialélica
017	AACF	63	M	S	+	aa	NI	AG	NA	Metilação monoalélica/A
020	BPS	62	F	N	+	ab	b	AG	NA	NA
021	LAR	55	M	S	+	aa	NI	AG	Metilação monoalélica/A	Metilação monoalélica/A
024	AP	88	M	N	+	aa	NI	AG	NA	NA

027	JÁ	69	M	N	-	aa	NI	AG	Metilação monoalélica/A	-
028	JR	70	M	S	+	bb	NI	AG	NA	NA
031	LGA	63	M	N	+	ab	a	AG	Metilação bilateral	Metilação bilateral
033	VSC	40	M	S	+	ab	b	AG	Metilação bilateral	NA
041	FDVM	76	M	N	+	aa	NI	AA	NI	-
042	JS	72	M	S	+	aa	NI	AA	NI	-
059	JLL	65	M	S	+	ab	b	GG	NI	-
061	JGZ	70	M	S	+	ab	a	AA	NI	-
TCC papilífero de alto grau não invasivo										
008	GF	66	M	N	+	ab	a	AG	Metilação bilateral	NA
032	AG	76	M	S	+	ab	b/ab	AG	Metilação bilateral	NA
037	L	81	F	nd	+	aa	NI	AA	NI	-
050	ZCA	69	F	S	+	ab	b	AA	NI	-

022	LAF	82	M	N		+	bb	NI	AG	Metilação bilateral	NA
058	MFF	68	M	N		+	bb	NI	AA	NI	-
TCC papilífero de baixo grau invasivo											
018	MLGJ	64	F	N		+	ab	a	AG	NA	Material insuficiente
TCC papilífero de alto grau invasivo											
005	GBS	73	M	N		+	bb	NI	AG	Metilação monoalélica/G	Metilação monoalélica/G
007	ABS	77	M	N		+	ab	a	AG	NA	Material insuficiente
015	LCS	71	F	S		+	aa	NI	AG	Metilação monoalélica/A	Metilação monoalélica/A
029**	AJB	52	M	N		+	ab	b	AG	Metilação bilateral	NA
046**	AJB	52	M	nd		-	ab	b	GG	NI	-
023	LGC	65	M	N		+	ab	a	AG	NA	NA
026	FB	67	M	N		-	ab	a	AG	NA	-

030	MAS	72	F	N	+	ab	a	AG	Metilação bilateral	NA
036	SG	70	M	S	+	ab	b	AA	NI	-
069	ER	52	M	N	+	aa	NI	AA	NI	-
TCC baixo grau não invasivo										
001	JJMS	60	M	N	+	ab	a	AG	Metilação bilateral	Metilação bilateral
014	AS	71	M	N	+	bb	NI	AG	Metilação bilateral	Metilação bilateral
035	NCF	79	F	N	+	ab	a	AA	NI	-
055	AB	82	M	S	+	ab	a	AA	NI	-
071	AC	63	M	S	-	ab	a	AA	NI	-
TCC alto grau não invasivo										
049	SSO	42	F	N	+	aa	NI	AA	NI	-
003	WRL	52	M	N	+	aa	NI	AG	Metilação monoalélica/A	Metilação monoalélica/A
006	OPO	72	M	S	+	ab	ab/ab	AA	NI	-
TCC alto grau invasivo										

002	NS	69	M	S	+	ab	a	AG	Metilação bilateral	Metilação bilateral	
004	ITM	68	F	S	+	bb	NI	AG	Metilação bilateral	Metilação bilateral	
016	DAS	51	M	S	+	aa	NI	AG	Metilação monoalélica/A	Metilação monoalélica/A	
019	FPD	80	M	S	+	aa	NI	AG	NA	NA	
040	ACG	ND	M	N	-	ab	a	AA	NI	-	
065	LJP	61	M	S	+	ab	b	AG	Metilação bilateral	NA	
068	AGO	62	M	N	-	ab	b	AA	NI	-	
TCC de baixo e alto grau											
064	AN	67	M	S	-	aa	NI	AG	Metilação monoalélica/A	-	
Outros											
009	HFS	75	M	N	+	bb	NI	AG	Metilação monoalélica/G	Metilação bilateral	
057	BGAS	62	F	S	+	ab	a	AA	NI	-	
060	JAM	71	M	N	+	bb	NI	AA	NI	-	

013	AV	70	M	S	+	bb	NI	AG	Metilação monoalélica/G	Material insuficiente
-----	----	----	---	---	---	----	----	----	----------------------------	--------------------------

* Amostra pareada de epitélio morfológicamente normal no fragmento adjacente ao tumor confirmado após análise histológica;

** - amostras coletadas em diferentes tempos provenientes de um mesmo paciente.

NI – amostra não informativa (homozigota); na – não analisado devido a problemas na amplificação pela PCR; - não se aplica ou ausente.

A comparação da genotipagem do RFLP *HhaI* (SNP rs10732516) entre as amostras pareadas mostrou concordância em todas as amostras. Esta informação é relevante para os casos heterozigotos, pois sugere que em todas as amostras tumorais não houve perda de alelos (ausência de perda de heterozigose ou LOH) (Figura 6). Dessa forma, as amostras tumorais mostrando retenção de ambos os alelos foram elegíveis para o ensaio de MSRE-PCR-RFLP. Após a digestão com a enzima de restrição *HpaII* (sensível à metilação do DNA) e repetição do ensaio de genotipagem observou-se a manutenção do padrão de metilação alelo-específico em 26 amostras tumorais. Destas, 22 apresentavam tecido normal pareado. A comparação dos dados deste ensaio entre o tecido tumoral e normal foi concordante em todos os casos e indica a especificidade dos padrões de *imprinting* herdados bem como a reprodutibilidade do experimento. Como exemplo, as amostras tumorais 029 e 046 coletadas em diferentes tempos do mesmo paciente foram heterozigotas e, em ambas, houve a manutenção do *imprinting* da DMR com o alelo **b** detectado como sendo o metilado em ambas.

Casos:

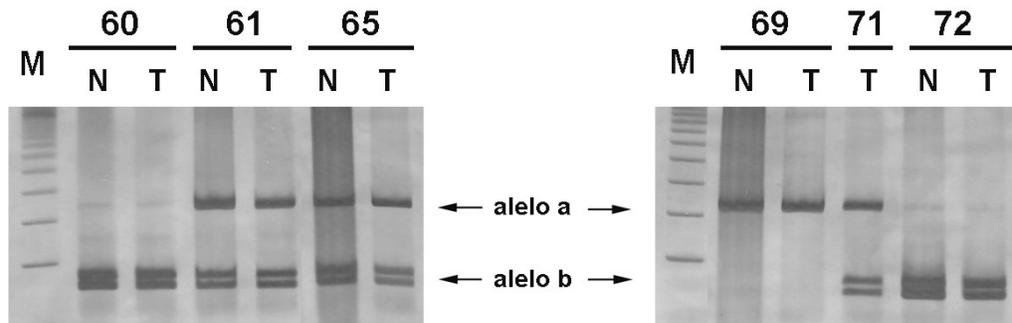


Figura 6. Genotipagem do RFLP *HhaI* em amostras pareadas de DNA normal e tumoral. Os casos 61, 65 e 71 exemplificam amostras heterozigotas com retenção de ambos os alelos nas células tumorais (casos informativos). O caso 60 é homozigoto para a presença do sítio (alelo **b**) e o caso 69 homozigoto para a ausência do sítio de restrição (alelo **a**).

Desvios do padrão de metilação alelo-específico do sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR foram detectados em duas amostras: a amostra 006 (TCC de alto grau não invasivo), que mostrou metilação bialélica tanto no tecido tumoral quanto no normal adjacente ao tumor e a amostra 032 (TCC papilífero de alto grau não invasivo) com perda do padrão de metilação alelo-específica restrita às células tumorais (Figura 7).

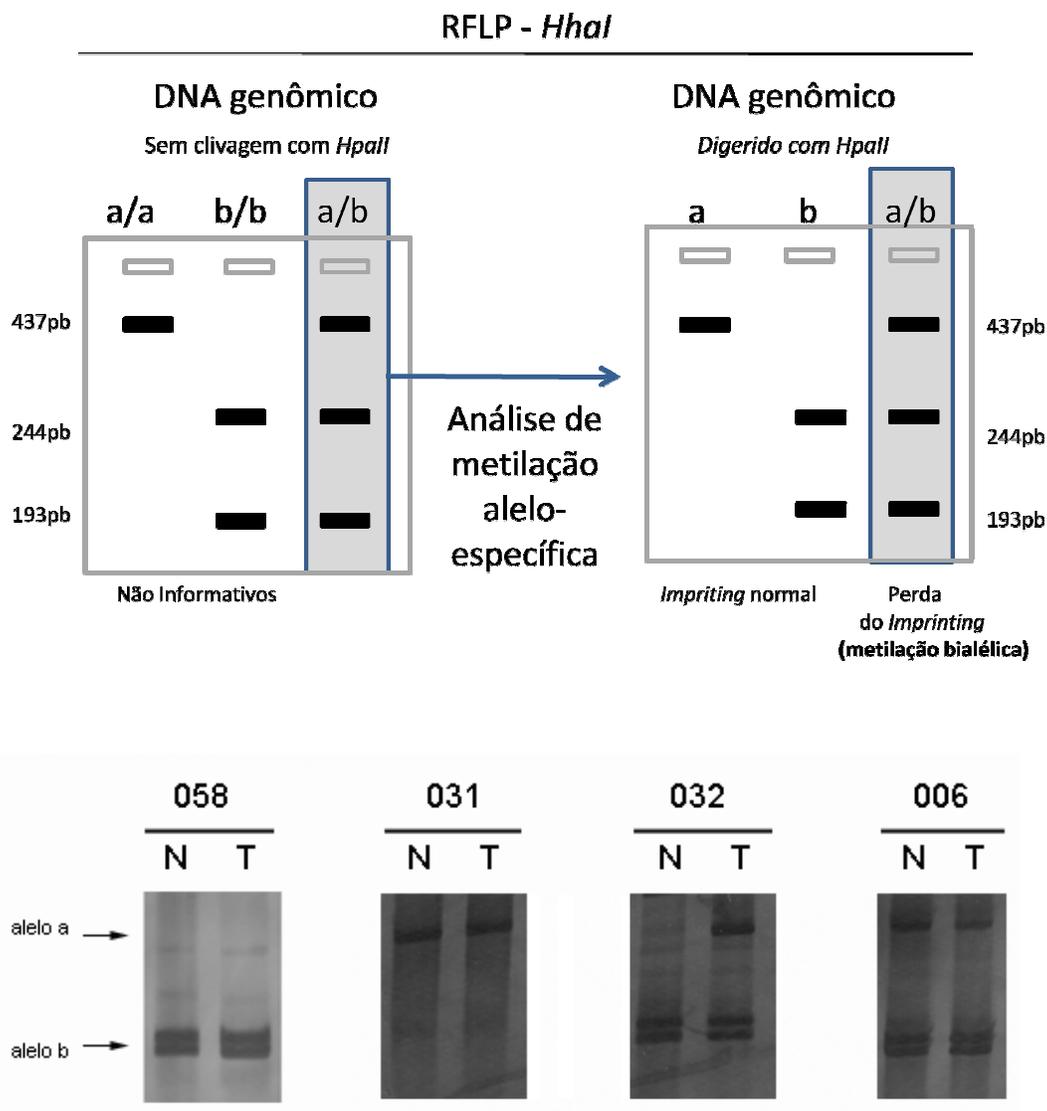


Figura 7. Análise do padrão de metilação alelo-específica por MSRE-PCR-RFLP. Os casos 058 e 031 mostram retenção do padrão de *imprinting* e os casos 032 e 006, a metilação bialélica da DMR.

Para a padronização do ensaio de MSP-CTPP, inicialmente a transição A>G localizada no éxon 1 do gene *H19* foi genotipada (SNP rs2067051) em todas as amostras utilizando-se uma abordagem baseada em PCR alelo-específica com dois conjuntos de *primers* onde cada alelo é discriminado pela base nitrogenada da posição 3'OH de um membro de cada par de oligonucleotídeo. Inicialmente, foram

utilizadas amostras de DNA do sangue periférico obtida de seis voluntários sadios sem câncer. Após a amplificação, foi detectado um produto constante de 426pb (*primer set* H19-GR e H19-AF), e a presença de uma banda de 189pb que identifica o alelo G (*primer set* H19GF e H19-GR) e uma de 277pb para o alelo A (*primer set* H19-AR e H19-AF) após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata. Para a confirmação da especificidade do ensaio, a banda constante de 426pb que contém o polimorfismo foi sequenciada nos dois sentidos (Figura 8).

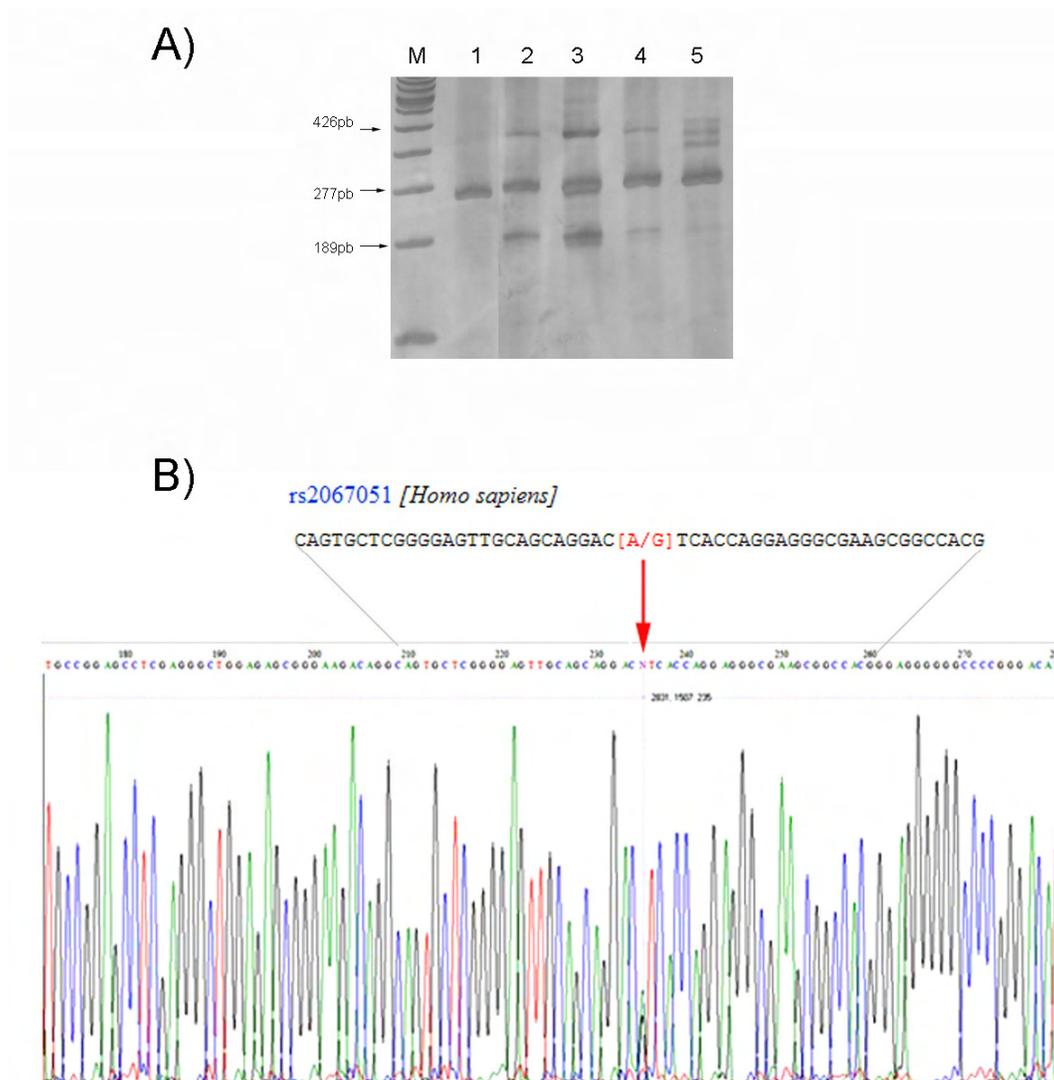


Figura 8. **A)** Eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos da PCR com os oligonucleotídeos para a genotipagem do polimorfismo detectado por CTPP. As amostras 1, 2 e 3 demonstram as três bandas esperadas para indivíduos heterozigotos. **B)** Sequência parcial do éxon 1 do gene *H19* mostrando a transição A>G em um indivíduo heterozigoto obtida pelo sequenciamento direto da banda de 426pb. A seta vermelha indica a sobreposição dos picos verde (alelo A) e preto (alelo G), confirmando a análise em gel.

A genotipagem deste polimorfismo entre os pacientes com carcinomas uroteliais mostrou um total de 32 heterozigotos, 17 homozigotos para o alelo A e dois homozigotos para o alelo G. As frequências do alelo A e G foram 0,65 e 0,35, respectivamente.

Dentre os 32 pacientes heterozigotos, 26 foram representados por pares de tecidos tumoral e normal do mesmo paciente; em cinco somente o tecido tumoral (amostras 07, 018, 026, 027 e 064) e em uma somente o tecido normal (013) estava disponível para o estudo por MSP-CTPP. As amostras 013, 027 e 064 mostraram padrão de metilação monoalélico e a quantidade de DNA das amostras 07, 018 e 026 não foi suficiente para esta análise. Vinte e uma amostras de tecido tumoral foram avaliadas (19 amostras pareadas, duas amostras tumorais isoladas descritas acima) e uma amostra de tecido normal. Dentre os 19 pares, a análise foi conclusiva em 12, sendo 11 pares com padrões concordantes (seis bialélicos e cinco mostrando metilação monoalélica do éxon 1) e apenas o caso 009 (carcinoma espinocelular) mostrou padrão discordante com a metilação bialélica no tecido normal e monoalélica no tecido tumoral (Figura 9).

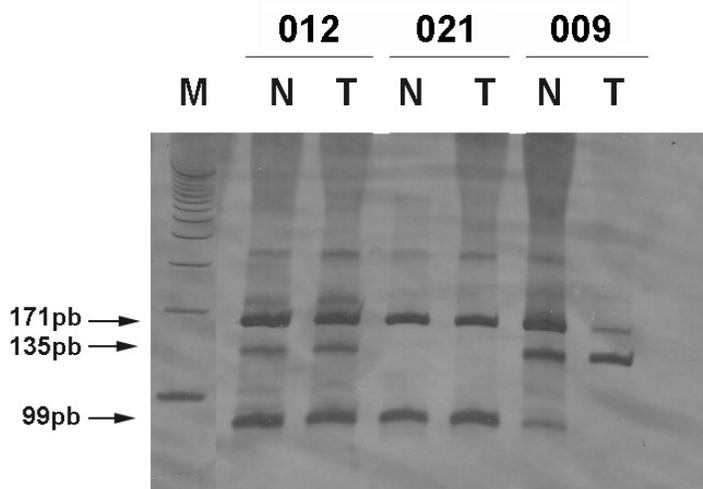


Figura 9. Análise de MSP-CTPP em amostras de DNA normais e tumorais. Exemplos de metilação monoalélica podem ser observados nas amostras 012 e 021 e bialélica nas amostras 009.

Na tabela 4 encontram-se apresentados os resultados da análise de metilação alelo-específica do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR confrontado com a análise de expressão alelo-específica do gene *H19* nas linhagens celulares.

Tabela 4. Resultados do ensaio de metilação alelo-específica da DMR e do padrão de expressão do gene *H19* em linhagens celulares derivadas de carcinomas humanos.

Linhagem	Genotipagem	Metilação	Genotipagem	Expressão
	RFLP <i>HhaI</i>	Alelo-específica MSRE-PCR-RFLP	RFLP <i>RsaI</i>	Alelo-específica
T24	bb	NI	aa	NI
5637	ab	Metilação monoalélica (a)	bb	NI
HCT116	bb	NI	bb	NI
DKO	bb	NI	bb	NI
HeLa	bb	NI	ND	ND

a – ausência do sítio polimórfico; **b**- presença do sítio polimórfico; NI – não informativa; ND – não disponível.

Somente a linhagem 5637 foi heterozigota para o RFLP *HhaI* e, portanto, informativa para a análise do padrão de metilação alelo específico da DMR. Esta linhagem mostrou manutenção do padrão de *imprinting* desta região evidenciada pela detecção de metilação do alelo **a** após a digestão com *HpaII* (Figura 10). Este padrão não foi alterado após o tratamento desta linhagem com o agente desmetilante 5Aza. A análise das células HeLa foi realizada a partir de DNA disponível comercialmente como controle hipermetilado (*New England BioLabs*).

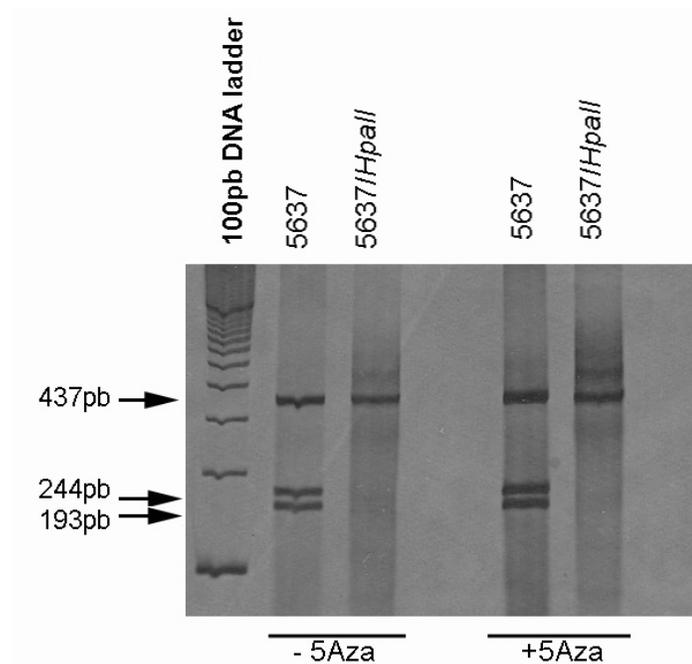


Figura 10. Análise do padrão de metilação alelo-específico da DMR na linhagem 5637 antes e após o tratamento com o agente desmetilante 5Aza. A linhagem é heterozigota para o RFLP *HhaI*. Após a digestão do DNA com a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* pode ser observada a metilação do alelo **a**, mesmo após o tratamento com a agente desmetilante.

Todas as linhagens expressaram o gene *H19*, em níveis diferentes conforme ilustrado na figura 11. Embora o ensaio realizado não seja quantitativo, pode ser verificado que a intensidade das bandas do gene controle endógeno *GAPDH* é homogênea entre as linhagens e que as bandas referentes à expressão do gene *H19* é menos intensa na linhagem T24, intermediária na 5637 e mais intensa nas linhagens HCT116 e DKO. O tratamento com 5Aza não interferiu nos níveis de expressão do gene *H19*. Adicionalmente, a genotipagem do RFLP *RsaI* mostrou que nenhuma delas era heterozigota e, portanto, todas foram não informativas para

a análise de expressão alelo-específica (Figura 12). Este fato, também impediu a análise do efeito da 5Aza na re-expressão do alelo metilado.

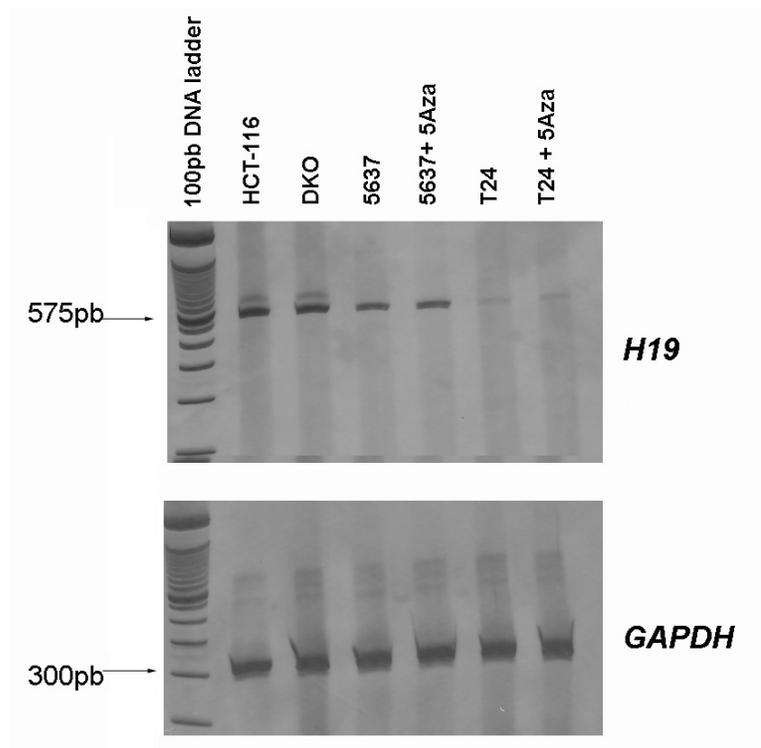


Figura 11. Expressão do gene *H19* nas linhagens celulares.

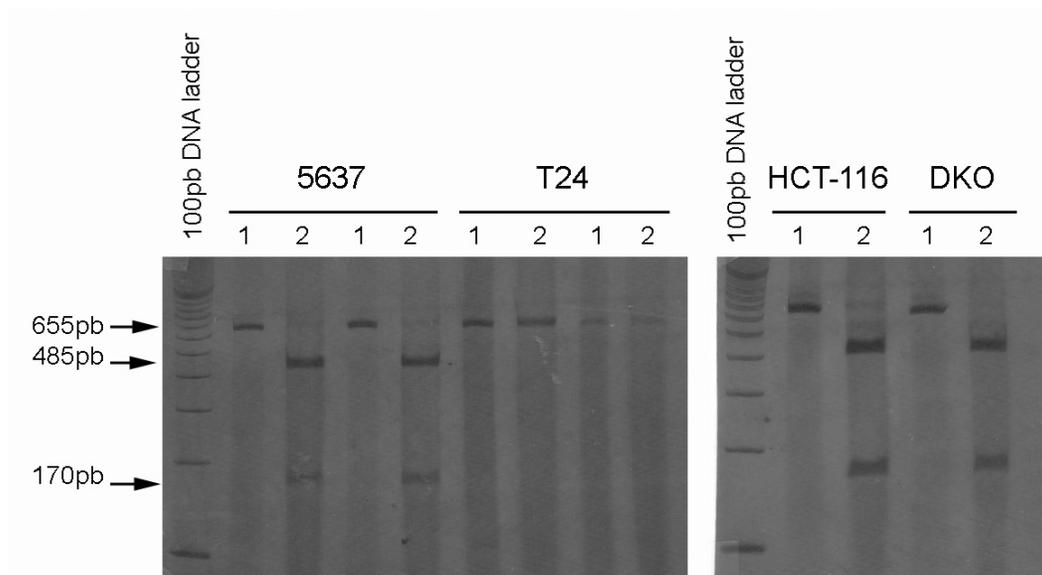
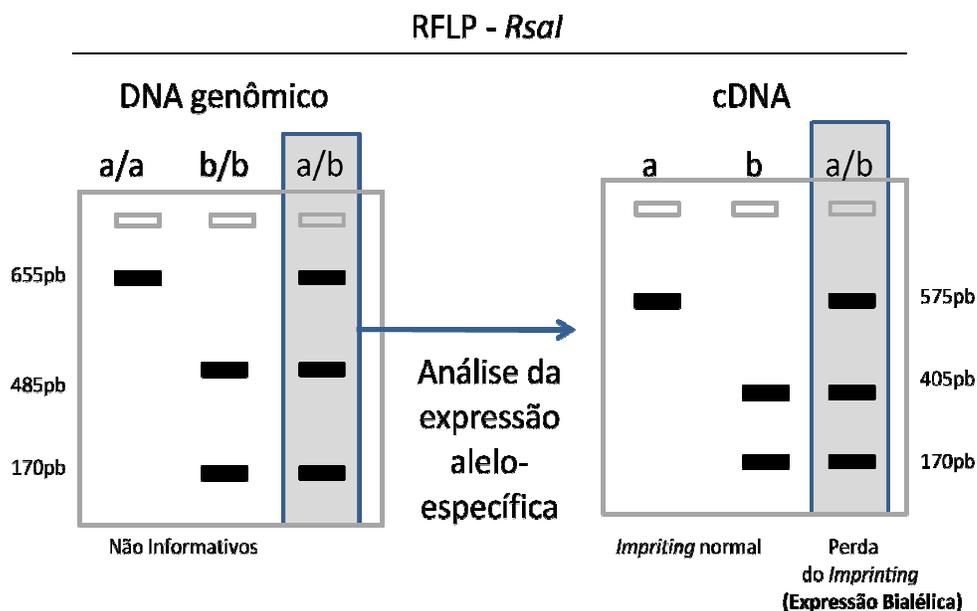


Figura 12. As quatro linhagens mostraram genótipos homocigotos para o RFLP *RsaI* e, portanto, não foram informativas para a análise do padrão de expressão alelo específico. As linhagens 5637 e HCT116/DKO foram homocigotas para a presença do sítio (alelo **b**) e a T24, homocigota para o alelo **a** (ausência do sítio polimórfico). 1 – DNA não digerido com *RsaI*; 2 - após a digestão com *RsaI*.

Embora não efetivos, os ensaios com as linhagens foram realizados na tentativa de se obter controles mostrando metilação bialélica e outro com ausência de metilação da DMR para os ensaios de qMSP.

Para esta análise, inicialmente os *primers* desenhados para a quantificação dos alelos metilados, não metilados e do normalizador (gene *ACTB*) foram testados numa PCR tradicional a partir do DNA do sangue periférico de voluntários sadios modificado pelo bissulfito de sódio. Os produtos foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração por nitrato de prata (Figura 13). Em seguida, os testes foram conduzidos no sistema *StepOne Real Time PCR system*, variando-se as concentrações de *primers* e o protocolo de modificação do DNA.

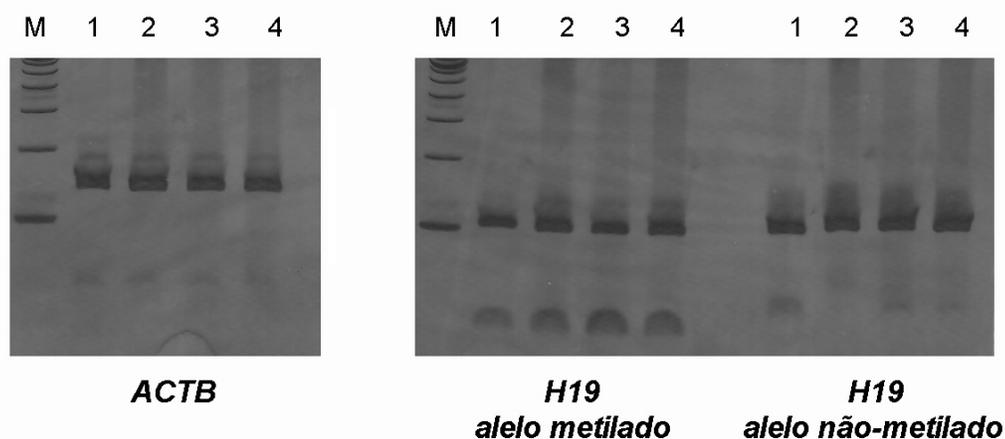


Figura 13. Produtos de amplificação pela PCR com os *primers* desenhados para os ensaios de qMSP. Apesar das bandas esperadas para cada par de *primer*, nota-se a presença de *primers* não consumidos e de pequenas bandas inespecíficas próximas aos produtos esperados, indicando a necessidade de padronização da reação de amplificação.

Inicialmente, o DNA extraído das linhagens celulares 5637 e T24 (tratadas ou não com o agente desmetilante 5Aza), HCT116 e DKO e o DNA controle

hipermetilado de células HeLa e o DNA controle desmetilado obtido após dois ciclos de amplificação do genoma foram modificados pelo bissulfito e utilizados na quantificação dos alelos metilados e não metilados do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR, pela abordagem de curva padrão relativa e cálculo da PMR e PUR. Na tabela 5 estão apresentados os dados desta quantificação. Conforme esperado, a linhagem 5637 que mostrou padrão de metilação monoalélico no ensaio de MSRE-PCR-RFLP mostrou valores de PMR e PMU próximos a 50%. A linhagem T24 é hipometilada (Figura 14). Após o tratamento com 5Aza, houve um pequeno aumento de alelos não metilados na linhagem 5637. A linhagem HCT116 mostrou quantidades aproximadamente iguais de alelos metilados e não metilados, enquanto a DKO hipometilação desta região (Figura 15).

Tabela 5. Quantificação da metilação do DNA no sexto sítio de ligação do fator CTCF.

Amostra	PMR (%)	PUR (%)
5637	51,70	48,30
5637+Aza	41,96	58,04
T24	0,01	99,99
T24+Aza	0,00	100,00
Controle HeLa hipermetilado	99,98	0,02
Controle desmetilado	0,19	0,012
HCT116	53,90	46,10
DKO	0,03	99,97

PMR – percentage of methylated reference; PUR – percentage of unmethylated reference.

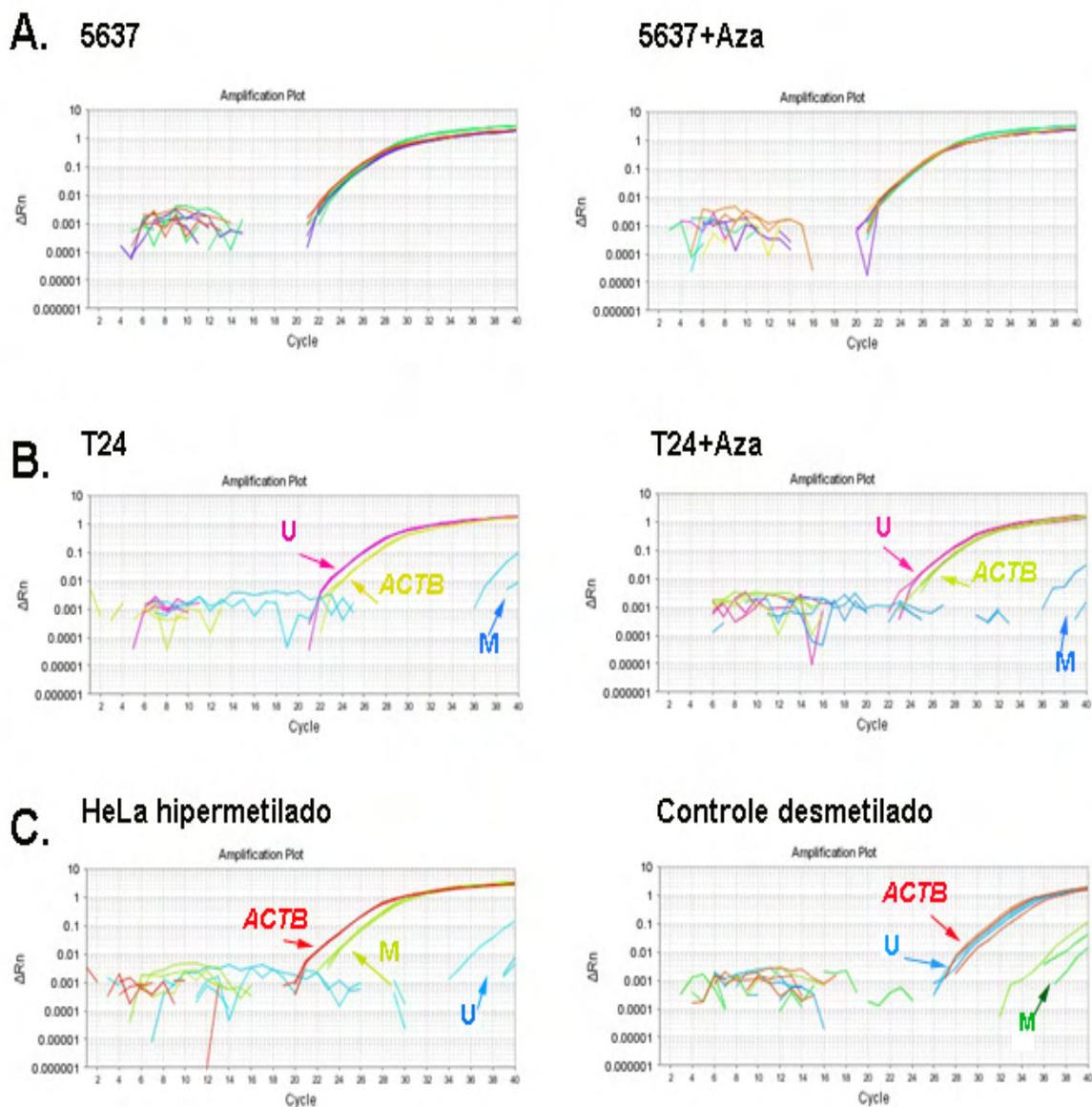


Figura 14. Curva de amplificação dos alelos metilados (M), não metilado (U) e normalizador (ACTB). **A)** Nota-se que as três curvas se sobrepõem, indicando iguais proporções de alelos metilados e não metilados na linhagem 5637, mesmo após o tratamento com a agente desmetilante Aza. **B)** A linhagem T24 é naturalmente hipometilada. **C)** Conforme esperado, o controle hipermetilado não gera produtos na reação de amplificação com o *primer set* para a amplificação de alelos não metilados e o contrário é observado no controle desmetilado.

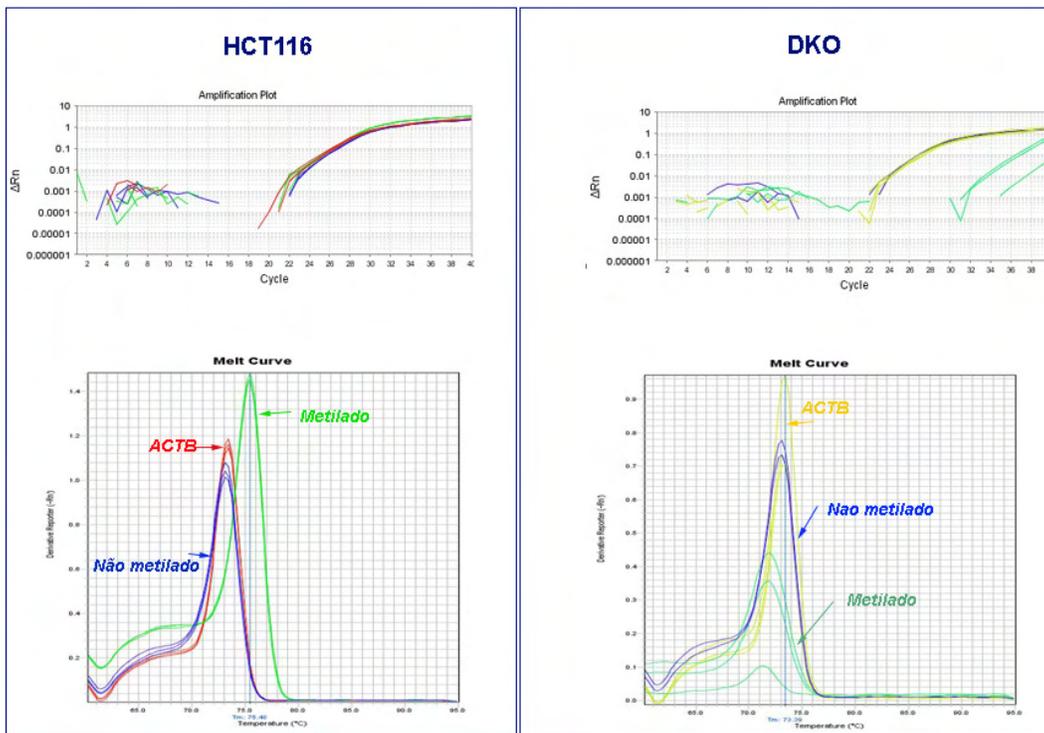


Figura 15. A linhagem HCT116 mostra manutenção do *imprinting* do sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR, enquanto que a DKO, que possui desmetilação biológica, não mostra a amplificação de alelos não metilados. As curvas de dissociação apresentadas abaixo de cada curva de amplificação atestam a especificidade dos produtos de cada reação de PCR. Os sinais detectados na reação com o par de *primer* para a detecção de alelos não metilados na linhagem DKO provavelmente representa artefatos da reação.

A partir destes dados, foram construídas novas curvas-padrão utilizando-se o DNA da linhagem HeLa e da DKO como controles hipermetilado e desmetilado (Figuras 16-18).

ACTB

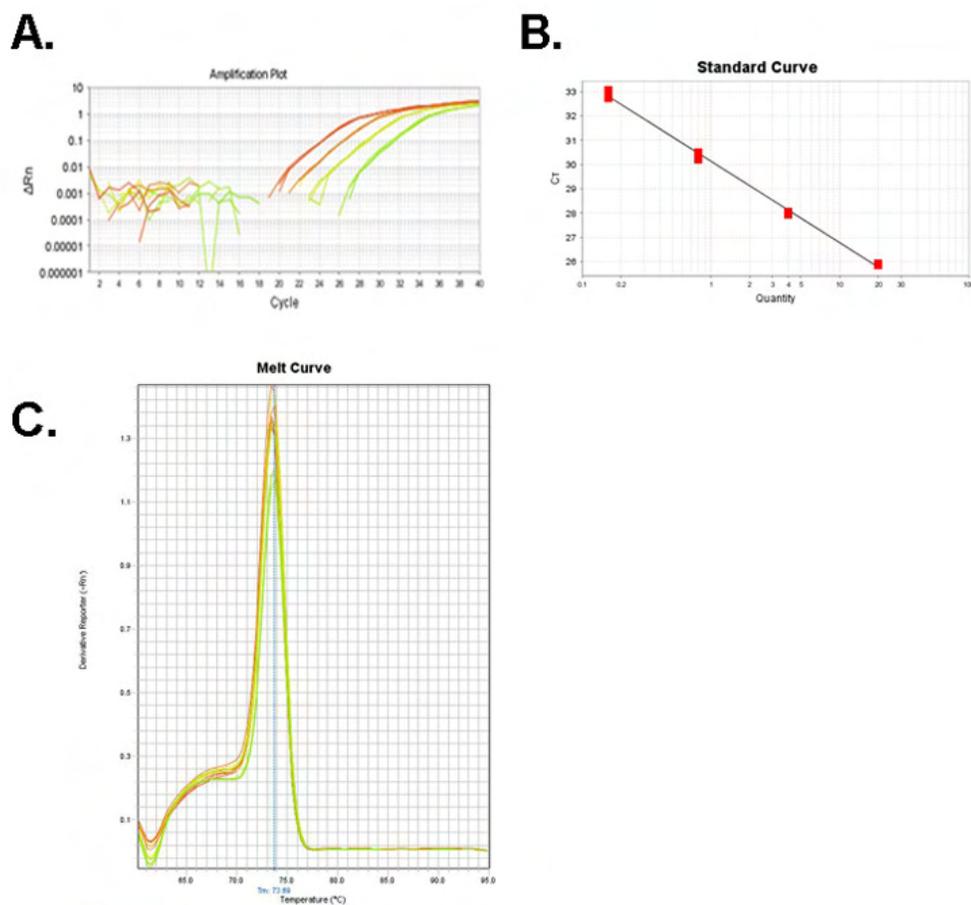


Figura 16. Padronização da amplificação do normalizador ACTB. **A)** *Amplification plot* das diluições seriadas utilizadas na construção da curva padrão (slope -3,343, R^2 0,996 e eficiência de 99%)(**B**). **C)** Curva de dissociação dos produtos amplificados.

H19 metilado

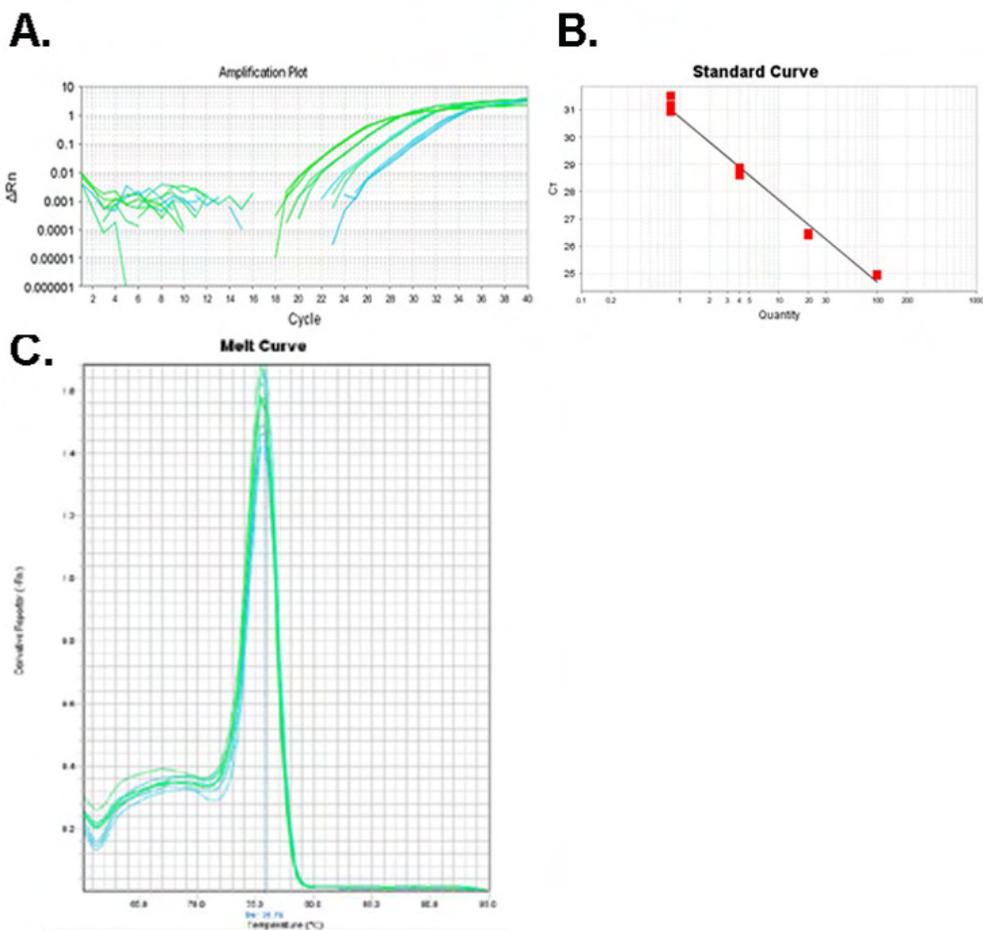


Figura 17. Padronização da amplificação dos alelos metilados. **A)** *Amplification plot* das diluições seriadas utilizadas na construção da curva padrão (slope -3,028, R^2 0,986 e eficiência de 113%)(**B).** **C)** Curva de dissociação dos produtos amplificados.

H19 não metilado

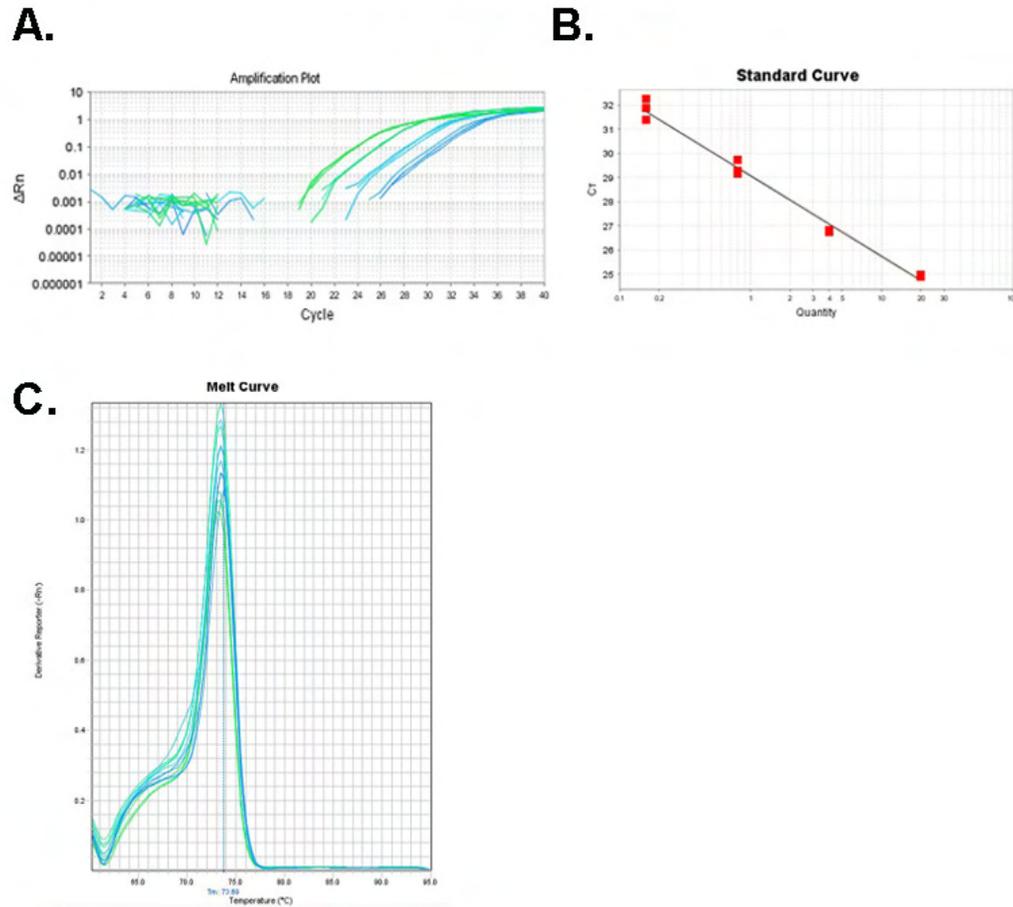


Figura 18. Padronização da amplificação dos alelos não metilados. **A)** *Amplification plot* das diluições seriadas utilizadas na construção da curva padrão (slope -3,246, R^2 0,99 e eficiência de 103%)(**B).** **C)** Curva de dissociação dos produtos amplificados.

A partir desses dados, aplicou-se o método do C_t relativo ou $\Delta\Delta C_t$ para o cálculo da quantidade de alelos metilados e não metilados nas amostras de DNA tumoral e normal adjacente ao tumor em relação ao DNA de referência (*pool* de DNA de linfócitos do sangue periférico). Foi observado um aumento na quantidade de alelos metilados no DNA tumoral (Figura 19 e 20) quando comparado ao DNA normal adjacente ao tumor (anexo 3).

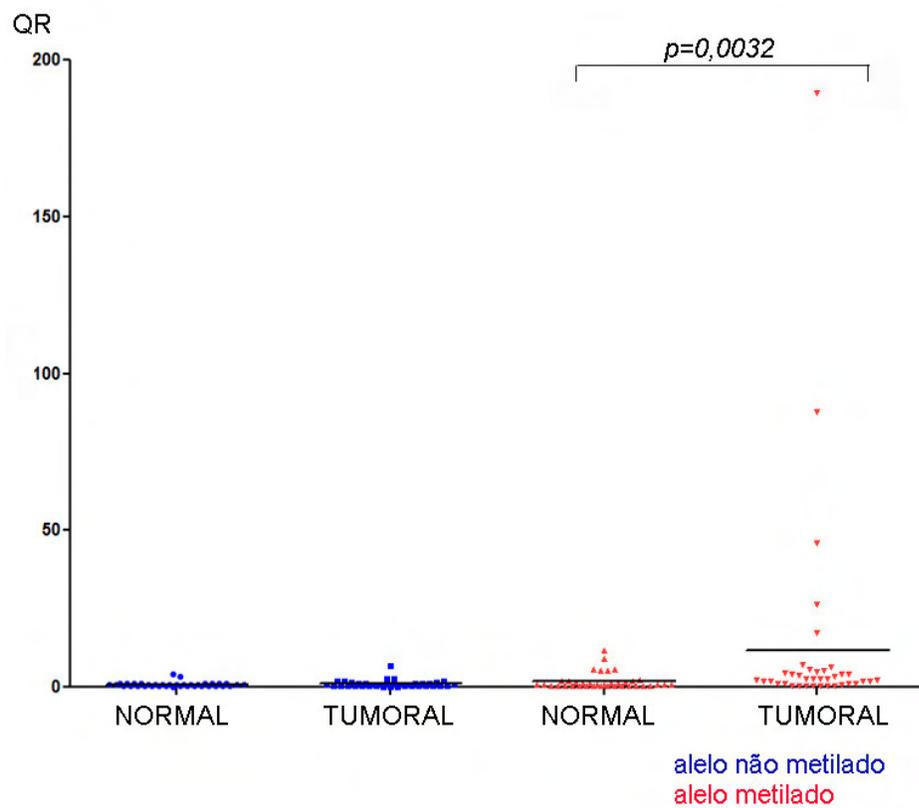


Figura 19. Quantificação relativa (QR) dos alelos não metilado e metilado do sexto sítio de metilação da DMR do gene *H19* entre amostras pareadas de tumores uroteliais e tecido normal adjacente ao tumor

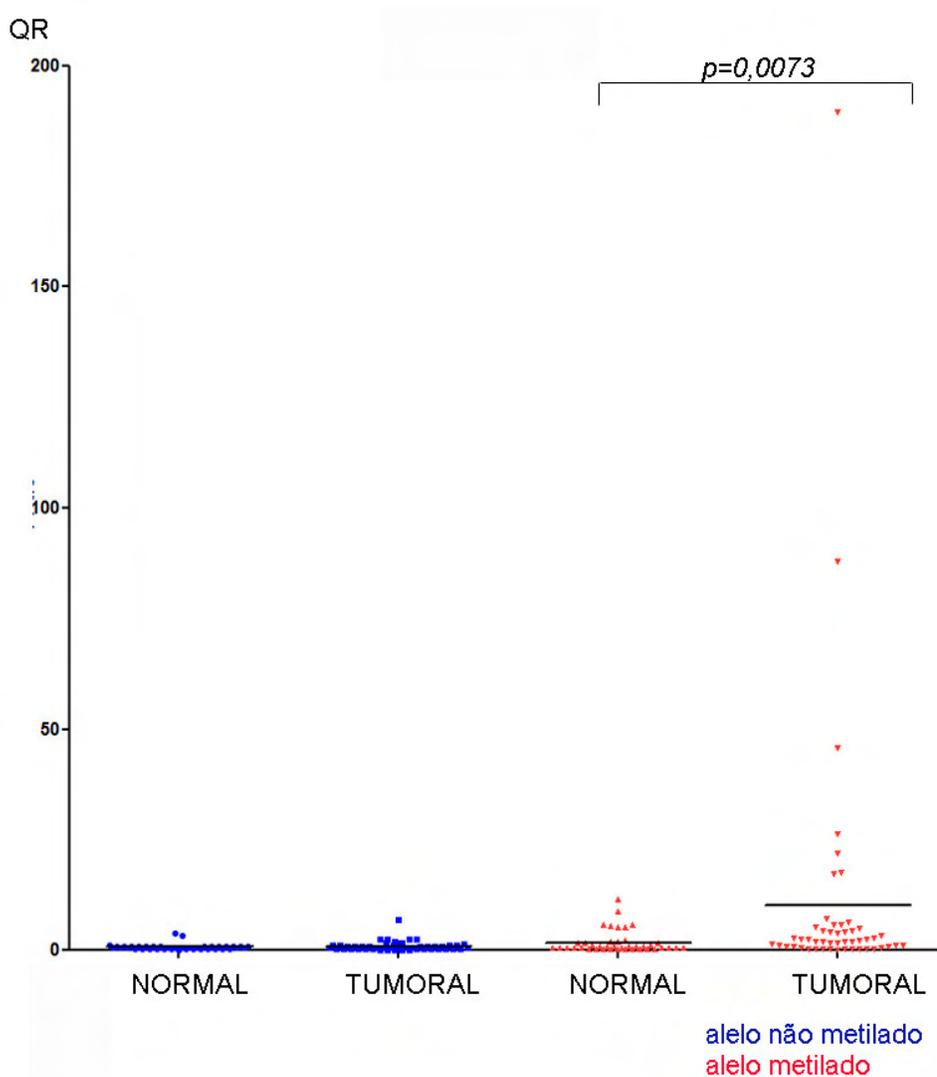


Figura 20. Quantificação relativa (QR) dos alelos não metilado e metilado do sexto sítio de metilação da DMR do gene *H19* de tumores uroteliais e tecido normal adjacente ao tumor.

A análise da distribuição da quantidade relativa de alelos metilados em relação aos parâmetros clínico histopatológicos, mostrou uma correlação entre aumento de metilação em tumores com padrão de crescimento papilífero (Mann-Whitney test, $p= 0,0218$) e uma tendência de correlação com ausência de invasão

($p= 0,0758$), mas não com o grau histológico e recorrência ($p=0,5279$ e $p= 0,3451$, respectivamente) (Figura 21).

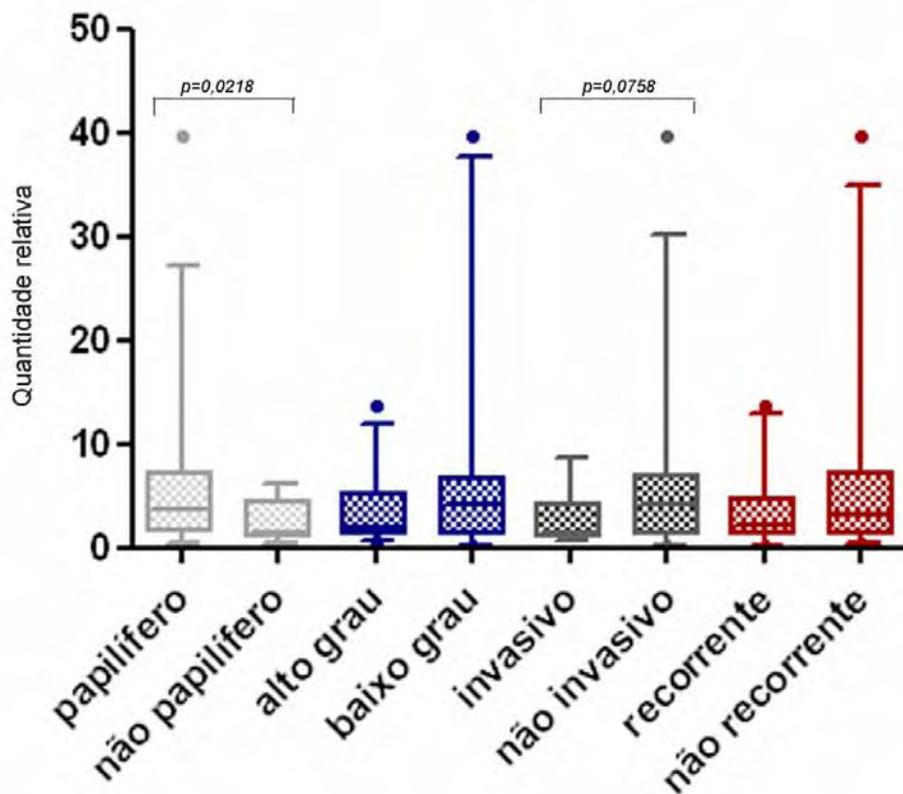


Figura 21. Quantificação relativa do alelo metilado no sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR do gene *H19* em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

V. DISCUSSÃO

A busca por marcadores moleculares tumorais que possibilitem o diagnóstico de câncer em estágio inicial, de forma precisa, pouco invasiva e específica é um dos grandes objetivos dos estudos relacionados à doença. Os marcadores moleculares podem permitir a determinação do prognóstico do tumor, de possível recidiva e possibilitar o uso de terapias específicas e mais eficazes. Em câncer de bexiga, alguns marcadores detectáveis na urina estão sendo investigados, mas o seu uso clínico de rotina ainda é incerto e de baixa acurácia (Almeida et al., 2007; Andriolo 2008; Enokida, 2008).

O aumento da expressão do gene *H19* tem sido relatado por diversos autores como marcador de recorrência para o câncer de bexiga. O gene *H19* é abundantemente expresso em estágios iniciais do desenvolvimento e praticamente não se expressa na vida pós-natal. Ariel et al. (1995) relataram a re-expressão do gene *H19* em tumores uroteliais. Os autores observaram a expressão nula na mucosa normal da bexiga e em dois casos de tumores papilíferos não invasivos. Em tumores mais avançados, houve um aumento relevante da expressão, especialmente em casos com invasão da camada submucosa e da musculatura. A expressão aumentada também foi observada em áreas de carcinoma *in situ* adjacente ao tumor invasivo. Nesse trabalho, os autores sugeriram que a expressão do gene *H19* está correlacionada com a perda de diferenciação e que ela poderia ser considerada um marcador tumoral para câncer de bexiga.

Em um estudo posterior, Cooper et al. (1996) encontraram uma correlação significativa entre a expressão do gene *H19* e o estadiamento tumoral avançado. Em 35 casos estudados, foi observada uma correlação significativa entre expressão

do gene *H19* e grau tumoral. Padrões de expressão similares também foram encontrados nas células do epitélio embrionário.

Ariel et al. (2000) avaliaram a possível utilidade da expressão do gene *H19* como marcador tumoral em biópsias de carcinoma de células transicionais da bexiga (TCC). Neste estudo, a fração de células expressando o gene foi menor conforme o aumento do grau tumoral (perda da diferenciação). O período livre da doença (entre a primeira biópsia e a recorrência) foi significativamente mais curto em pacientes portadores de tumores com grandes frações de células expressando o gene *H19*. No entanto, o fato de o gene *H19* funcionar como uma molécula de RNA não codificador, não sendo traduzido em uma proteína que possa ser detectada em fluidos corpóreos, limita o seu uso como marcador. Ayesh et al. (2002) descreveram que a presença de altos níveis de *H19* influencia vários outros genes que possuem papel crucial no processo tumorigênico e concordaram com o valor preditivo do *H19* como marcador de recorrência tumoral, já que o transcrito pode ser detectado em mais de 75% dos tumores de bexiga.

Corroborando com esses dados, Elkin et al. (1995) investigaram a expressão do gene *H19* em linhagens celulares: os autores relataram a expressão baixa (linhagem HT-1376) ou nula (linhagens T24P, UM-UC-3 e EJ28) nas linhagens derivadas de carcinoma de bexiga humano, ao contrário dos tumores induzidos por elas em camundongos, o que poderia indicar que a expressão do gene *H19* é restrita à células do câncer de bexiga durante o processo de tumorigênese como resultado da ativação transcricional ou aumento da estabilização do RNA. A perda do *imprinting* desse gene permitindo a transcrição de ambos alelos poderia estar envolvida, de acordo com Elking et al. (1995), entretanto esta análise não foi possível pois as linhagens estudadas não eram heterozigotas para o RFLP *RsaI*.

Um possível evento que potencialmente poderia levar à expressão aumentada do gene *H19* é a perda do padrão de metilação alelo específico da DMR. Diferente de algumas ilhas CpGs intragênicas que colocalizam com sítios de início da transcrição de RNAs não codificadores *antisense* e que regulam negativamente a expressão do transcrito *sense*, a DMR do gene *H19* é uma região intergênica que contém ilhas de nucleotídeos CpG. No genoma humano, muitas ilhas CpGs hipermetiladas encontram-se localizadas no DNA intergênico e, desta forma, não possuem um papel bem determinado na regulação da expressão gênica. Entretanto, no caso da DMR localizada entre os genes *IGF2* e *H19*, acredita-se que a metilação parental específica determina a expressão por *imprinting* neste *locus*. A metilação no alelo paterno impede a associação do fator CTCF e promove a expressão monoalélica paterna enquanto que a ausência de expressão no alelo materno permite a expressão monoalélica materna do gene *H19*. Este modelo ilustra um mecanismo potencial pelo qual a hipermetilação de uma ilha CpG poderia determinar um efeito transcricional (Edwards e Ferguson-Smith, 2007).

Assim, a DMR é tida como um domínio chave no controle do *imprinting* dessa região e contém sete potenciais sítios de ligação da proteína CTCF, cada um contendo de três a cinco dinucleotídeos CpG. Trabalhos anteriores (Frevel et al., 1999 e Vu et al., 2000) reportaram que o sexto sítio é o que mostra metilação alelo-específica correlacionada com o padrão de expressão monoalélica dos genes *H19* e *IGF2*. Através de sequenciamento pós-modificação pelo bissulfato de sódio, Takai et al. (2001) avaliaram o padrão de metilação dos sete sítios de ligação da proteína CTCF em tecido embrionário, câncer de bexiga e tecido adjacente ao câncer de bexiga com perda de *imprinting*. Foi observada a hipometilação aberrante do sexto sítio de ligação do fator CTCF associada à perda do *imprinting* e aumento de

expressão do gene *H19*, corroborando com os dados de altos níveis de expressão deste gene em câncer de bexiga.

O presente trabalho teve como objetivo correlacionar o padrão de metilação alelo-específico do sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR do gene *H19* e a LOI desta região em câncer de bexiga. Utilizando uma abordagem qualitativa, baseada em amostras heterozigotas para um polimorfismo neutro (MSRE-PCR-RFLP), das 52 amostras de carcinoma urotelial provenientes de 51 pacientes, 28 eram heterozigotas, das quais somente duas apresentaram metilação bialélica, sendo em um caso somente no tecido tumoral (caso 032, TCC papilífero de alto grau não invasivo) e no outro tanto no tecido tumoral quanto no normal (caso 006, TCC alto grau não invasivo), representando 7% das amostras heterozigotas. Um aspecto relevante é que na maioria dos casos informativos, houve concordância entre o padrão de metilação monoalélica parental específica entre as amostras de tecido tumoral e normal adjacente ao tumor obtidas do mesmo paciente. Este achado demonstra a especificidade do padrão de metilação parental específico e a reprodutibilidade do ensaio de MSRE-PCR-RFLP. Utilizando a mesma abordagem do presente trabalho, Esteves et al. (2006) analisaram o padrão de metilação do sexto sítio de ligação da proteína CTCF em câncer de cabeça e pescoço e encontraram resultados semelhantes, com uma baixa frequência de metilação bialélica da DMR entre os casos informativos estudados.

Desvios do padrão de *imprinting* na região 11p15.5 já foram descritos em mais de 20 tipos tumorais. A perda de *imprinting* foi relatada em cânceres adultos e pediátricos e pode servir como marcador de avaliação de risco uma vez que parece preceder o desenvolvimento de câncer e foi sugerida como sendo essencial para a definição de subgrupos de pacientes (Cui et al., 2007).

Na tentativa de associação entre os padrões de metilação alelo-específico do sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR e de expressão monoalélica do gene *H19*, os ensaios de MSRE-PCR-RFLP e de RT-PCR foram conduzidos nas linhagens celulares 5637, T24 (derivadas de carcinomas de bexiga), HCT116 e DKO (derivadas de carcinoma de cólon). Apenas a linhagem 5637 foi informativa para o ensaio de MSRE-PCR-RFLP e mostrou manutenção do *imprinting* da DMR (metilação monoalélica). Apesar de todas as linhagens expressarem o gene, nenhuma foi informativa para o RFLP *RsaI*, o que impediu a análise de padrão de expressão alelo-específico.

Análises em linhagens celulares derivadas de câncer de bexiga foram realizadas por Cooper et al. (1996) para determinar se o padrão de expressão tinha relação com as propriedades *in vitro*. As linhagens HT1376, HT1197 e 5637 apresentaram aumentado nível de expressão de *H19*, sugerindo que o gene pode estar envolvido em vias biológicas que levam à migração e invasão tumoral. No presente estudo, níveis maiores de expressão foram observados nas linhagens 5637 e HCT116/DKO. A linhagem T24 apresentou baixos níveis de expressão. No nível de resolução da técnica de RT-PCR tradicional, não foram observados alterações nos níveis de expressão após tratamento com a agente desmetilante 5Aza. A perda de *imprinting* do gene *H19* claramente pode estar envolvida no desenvolvimento de carcinoma de bexiga, mas não deve ser somente a responsável pelo aumento dos níveis de expressão do gene, já que expressão aumentada foi observada em tumores expressando somente um alelo no estudo de Elking et al. (1995), além de a perda de *imprinting* da região que envolve os genes *H19* e *IGF2* não ser obrigatória para o desenvolvimento de câncer de bexiga. Verificando a relação entre metilação e *imprinting* do gene *H19*, Byun et al. (2007) analisaram por pirosequenciamento a

quantidade de metilação do DNA de cada alelo em câncer de bexiga. Neste estudo, não houve correlação entre metilação do DNA e expressão bialélica do gene *H19*. A expressão bialélica desse gene foi encontrada, assim como metilação bialélica da DMR, porém não foi possível correlacionar os dois fatos, embora o número amostral tenha sido pequeno, além de restrito os casos heterozigotos informativos exigidos nesta abordagem. Os autores sugeriram que a metilação aberrante na DMR do gene *H19* precede a expressão bialélica e que ela é um evento necessário, porém não suficiente para a perda de *imprinting*. Os resultados do presente estudo são concordantes com os relatos prévios da literatura mostrando ausência de correlação entre padrão de metilação da DMR e nível de expressão do gene *H19*: a linhagem 5637 com metilação monoalélica da DMR expressou níveis maiores deste gene em comparação com a linhagem T24, que mostrou hipometilação da DMR pelo ensaio quantitativo. Em adição, a amostra 032 que mostrou metilação bialélica no ensaio de MRSE-PCR-RFPL apresentou maiores níveis de metilação na amostra tumoral em comparação com o DNA de referencia na análise de qMSP; no entanto, o caso 006 esse aumento não foi tão evidente.

A análise qualitativa fornece importantes dados sobre o *status* de metilação mono ou bialélica da DMR. Porém a heterogeneidade das células tumorais pode mascarar a real quantidade de metilação presente em uma amostra tumoral por detectar somente ausência ou presença de metilação em cada alelo. Em adição, a técnica de MSRE-PCR-RFLP é um ensaio de baixa resolução, pois depende de amostras heterozigotas e avalia somente poucos dinucleotídeos CpGs em uma dada região. No presente estudo, os dinucleotídeos CpG das posições -2237 e -2062 bp flanqueando o sexto sítio de ligação do fator CTCF foram analisados por este ensaio. A qMSP é uma metodologia mais sensível para quantificar os alelos

metilados e não metilados da DMR. Com essa análise é possível quantificar o montante de alelos metilados e não metilados contidos em um *pool* de células tumorais, que pode conter células bialelicamente metiladas, monoalelicamente metiladas, ou nenhum dos alelos metilados.

Inicialmente, foram construídas curvas padrão a partir de DNA comercialmente hipermetilado (HeLa) que se mostrou próximo de 100% metilado e, curva padrão construída a partir da linhagem DKO, que se mostrou próximo de completamente desmetilado, após a avaliação e seleção destas amostras em um ensaio de quantificação baseada em curva padrão relativa e cálculos de PMR e PUR. O valor da eficiência das duas curvas foi semelhante e próximo de 100% (Hatterman et al., 2008). Assim, a quantificação dos alelos metilados e não metilados das amostras normais e tumorais foi baseada no método do CT comparativo ($\Delta\Delta CT$). A fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ dá o resultado da diferença de metilação entre a amostra alvo e a amostra referência. Esta quantificação também foi feita nas amostras tumorais em relação às células normais adjacentes ao tumor a fim de diluir possíveis fatores interferentes como idade, sexo e hábitos de vida existente entre os pacientes (Gallagher e Milowsky, 2009; Shariat et al., 2009). Em ambas comparações, foi observado um aumento significativo de alelos metilados em relação à amostra de referência. Uma maior quantidade de alelos metilados também foi associada a tumores mostrando o padrão de crescimento papilífero, bem como em tumores não invasivos. Estes dados discordam dos de Takai et al. (2001) que relataram a hipometilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR em carcinomas de bexiga. As diferenças metodológicas poderiam explicar, em parte, esta discrepância. A qMSP proporciona um método quantitativo e reprodutível para a análise da razão de metilação entre os dois alelos parentais, sendo representativa do DNA genômico

derivado de um *pool* de células. Em contraste, o sequenciamento do DNA tratado com o bissulfito de sódio revela o padrão de metilação de todos os dinucleotídeos CpGs contidos num fragmento de DNA, porém de um limitado número de moléculas individuais de DNA (Sandovici et al., 2003).

Uma terceira abordagem realizada com o mesmo grupo amostral foi baseada no trabalho de Sasamoto et al. (2004), que utilizou a técnica MS-CTPP. Essa abordagem também está limitada a casos heterozigotos, o que diminui o grupo amostral que pode ser avaliado. Porém, a região onde estão localizados os *primers* interroga uma parte da ilha CpG do primeiro éxon do gene *H19*. A investigação dos padrões de metilação do DNA tem se tornado uma importante ferramenta indireta para se entender a expressão gênica normal e patológica. Inicialmente, a análise de *loci* específicos só foi possível com o advento das enzimas de restrição sensíveis à metilação. Porém, as estratégias de análise da metilação do DNA foram revolucionadas pela introdução da conversão do DNA por bissulfito de sódio, em que as citosinas não-metiladas são convertidas a uracilas, mas as citosinas metiladas sendo resistentes a este tratamento (Laird, 2003). Embora também limitada à detecção de ganhos de metilação e à triagem de casos informativos, a análise de MSP-CTPP apresenta maior especificidade por basear-se na modificação prévia do DNA pelo bissulfito de sódio. Apenas um relato na literatura utilizou esta técnica em câncer gástrico e tumor de cólon (Sasamoto et al., 2004). Em adição, a MSP-CTPP apresenta como vantagens o baixo custo e a rapidez.

No presente estudo, 32 amostras foram heterozigotos para a genotipagem A/G, sendo que apenas 12 delas possuíam tecido morfológicamente normal pareado com tumoral. Onze destas mostraram metilação concordante entre tecido normal e tecido tumoral, sendo seis com metilação bialélica, cinco com metilação monoalélica

e apenas em um caso houve discordância entre tecido normal e tumoral, com metilação bialélica e monoalélica respectivamente. A heterogeneidade dos resultados encontrados para o padrão de metilação dessa região analisada pode ser reflexo da variação polimórfica anteriormente observada para este *locus*. No trabalho de Esteves et al. (2006), foi relatada a ocorrência de polimorfismo epigenético populacional no sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR em amostras de sangue de indivíduos normais. Sandovici et al. (2003) havia encontrado anteriormente uma heterogeneidade inter-individual na expressão mono ou bialélica e no padrão de metilação de genes controlados por *imprinting* na população.

Mudanças no padrão de metilação não refletem perda de *imprinting* necessariamente, a menos que altere a transcrição parental alelo-específica. A heterogeneidade epigenética do *imprinting* genômico pode influenciar o fenótipo, principalmente em relação ao desenvolvimento de câncer e pode ser regulada por variações no grau de metilação, na acetilação de histonas e proteínas repressoras que se ligam a cromatina. A identificação da variabilidade inter-individual nos mecanismos responsáveis por estabelecer e manter os padrões de metilação da DMR do gene *H19*, além de fatores genéticos e ambientais, representa um importante passo para determinar como os mecanismos epigenéticos podem modular o risco de desenvolvimento de câncer (Tycko, 2000 e Verma et al., 2003).

A análise baseada em enzimas de restrição sensíveis à metilação proporciona uma visão geral do padrão de metilação da região alvo. No presente estudo, a técnica de MSRE-PCR-RFLP foi utilizada em um subgrupo de pacientes (55%), pois se restringe a amostras sabidamente heterozigotas para um marcador neutro utilizado para diferenciar os alelos. Recentemente, Verhaegh et al. (2008)

investigaram a associação entre polimorfismos no gene *H19* e o risco de câncer de bexiga. O polimorfismo rs2839698 foi associado com um risco diminuído de câncer e com um baixo risco de desenvolvimento de tumores invasivos. No estudo de Esteves et al. (2006) não foi observada associação entre o RFLP *HhaI* (RS 10732516) e o risco de desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço embora tenha sido detectada uma tendência de associação entre o genótipo homocigoto para presença do sítio polimórfico e a ocorrência destes tumores. Este polimorfismo é uma transição C/T localizada no sexto sítio de ligação do fator CTCF e, especificamente corresponde ao segundo dos quatro dinucleotídeos CpGs dentro da região crítica de ligação da proteína. Em razão de um possível efeito funcional deste SNP no nível de expressão do gene *H19*, realizou-se a comparação dos dados de genotipagem do presente estudo com o grupo controle formado por 157 brasileiros saudáveis sem câncer relatados em nosso estudo anterior (Esteves et al., 2006), e não houve uma associação significativa entre os diferentes genótipos do RFLP *HhaI* e o risco de câncer de bexiga (OR=0.61, IC=0,31-1.22).

Atualmente, nenhum método de detecção de metilação está estabelecido para um teste confiável, rápido e produtivo de metilação *locus*-específica que seja prontamente aplicável para pesquisa e diagnóstico. As abordagens de MSRE-PCR-RFLP permitiram uma avaliação qualitativa dos padrões de metilação do gene *H19*. Embora úteis e de fácil execução, estas técnicas possuem como principal desvantagem a dependência da identificação de amostras heterocigotas para polimorfismos genéticos, o que invariavelmente reduz o número de amostras passíveis de análise. A quantificação dos desvios de metilação do DNA da DMR é uma alternativa promissora capaz de contornar esta limitação. Com o advento da PCR em tempo real, novas técnicas permitiram a análise quantitativa de regiões

metiladas mostrando alterações em células tumorais. A qMSP em tempo real foi desenvolvida para detecção e quantificação de regiões metiladas e não metiladas após o tratamento por bissulfito (Lo et al., 1999). Os métodos utilizados para pesquisa possuem várias limitações, e resultados contraditórios podem ser obtidos usando diferentes protocolos (Dobrovic, 2005). Uma alternativa promissora à qMSP é a HRM (*High Resolution Melting*), que foi originalmente desenvolvida para avaliação de alteração metilação-específica em câncer (Wojdacz, 2007). A técnica explora as diferenças no perfil de *melting* do *amplicon*, derivado de DNA modificado por bissulfito. Um *software* específico captura a mudança de fluorescência do corante intercalado no DNA dupla fita após a desnaturação do produto ao final da PCR (Wojdacz, 2008). O produto da PCR originalmente do alelo não metilado, tem uma baixa temperatura de *melting* comparado ao produto da PCR do alelo metilado. O perfil da HRM refletirá a composição de alelos metilados e não metilados presentes na amostra de DNA. Quando comparado com o *status* de metilação de controles positivos e negativos conhecidos, é possível dizer se a amostra está hipermetilada ou hipometilada. Apenas um estudo em literatura utilizou esta abordagem para a análise do gene *H19* em pacientes com a Síndrome de Beckwith-Wiedemann (Wojdacz, 2008). A HRM é uma abordagem promissora para a continuidade deste estudo.

VI. CONCLUSÕES

Os dados gerados no presente estudo permitiram a formulação das seguintes conclusões:

- O sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR do gene *H19* apresenta metilação diferencial no tecido urotelial normal representado pelo padrão herdado de metilação alelo-específico;
- A ilha CpG contida no éxon 1 do gene *H19* demonstra variação inter-individual quanto aos padrões herdados de metilação;
- Um subgrupo de carcinomas uroteliais mostraram variações nos padrões de metilação alelo-específico tanto no sexto sítio de ligação do fator CTCF quanto na ilha CpG do éxon 1 do gene *H19*, como alterações adquiridas durante o processo de carcinogênese;
- Os tumores uroteliais mostram ganhos de metilação no sexto sítio de ligação do fator CTCF na DMR em relação ao tecido normal adjacente; o aumento de alelos metilados correlaciona-se com o padrão de crescimento papilífero;
- A linhagem 5637 apresentou metilação monoalélica no ensaio de MSRE-PCR-RFLP compatível com os dados de qMSP (aproximadamente 50% de alelos metilados); a linhagem T24 não foi informativa para o ensaio de MSRE-PCR-RFLP, mas apresentou hipometilação do sexto sítio de ligação do fator CTCF da DMR pelo ensaio de qMSP (PUR aproximadamente igual a 100%). No entanto, o nível de expressão do gene *H19* foi maior na linhagem 5637 em relação à T24. Desta forma, as alterações no padrão de metilação alelo-

específico da DMR não correlacionaram-se com os níveis de expressão do gene *H19* nestas linhagens.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.R.C; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B.; FLEMING, T.R.P.; CARVALHO, V.H.; CARDOSO, A.A.A. Marcadore Tumorais: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53(3):305-316, 2007.
- American Joint Committee on Cancer (AJCC) cancer staging manual, 6th edn, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2002.
- ANDRIOLO, A. Marcadores Tumorais Bioquímicos Circulantes. **Anais do 1º Congresso Nacional de Saúde da Faculdade de Medicina da UFMG**. Belo Horizonte, 2008.
- ARIEL I. et al. The imprinted *H19* gene as a tumor marker in bladder carcinoma. **Urology**, v.45, N.2, 1995.
- ARIEL I. et al. The imprinted *H19* gene is a marker of early recurrence in human bladder carcinoma. **Mol Pathol**, v.53, p.320-323, 2000.
- AYESH S. et al. Possible physiological role of *H19* RNA. **Mol. Carcinog**, v.35, p.63-74, 2002.
- BELL A.C.; Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *IGF2* gene. **Nature**, v.405, p.482-485, 2000.
- BYUN H.M. et al. Examination of *IGF2* and *H19* loss of *imprinting* in bladder cancer. **Cancer Res**.15;67(22):10753-8, 2007.
- CAI X.; CULLEN, B.R. The imprinted *H19* noncoding RNA is a primary microRNA precursor. **RNA**, v.13, p.313-316, 2007.
- CALIN, G.A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**,v.Nov 26;99(24), p.15524-15529, 2002.
- COOPER M.J. et al. Developmentally imprinted genes as makers for bladder tumor progression. **The journal of Urology**, v.155, p.2120-2127, 1996.
- COSTA F.F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, v.410, p.9-17, 2008.
- COWLAND J.B.; HOTHER, C.; GRØNBAEK, K. MicroRNAs and cancer. **APMIS** v.Oct;115(10), p.1090-106, 2007.
- CUI H. et al. Loss of *IGF2 imprinting*: a potential marker of colorectal cancer risk. **Science**, v.299, p.1753-1755, 2003.
- CUI H. et al. Loss of *imprinting* in normal tissue of colorectal cancer patients with microsatellite instability. **Nat Med**, v.4, p.1276-1280, 1998.

- CUI H. Loss of *imprinting* of *IGF2* as an epigenetic marker for the risk of human cancer. **Disease Marker**, v.23, p.105-112, 2007.
- DOBROVIC, A. Methods for Analysis of DNA Methylation. In Coleman, W.B.; Tsongalis, G.J. (eds.), **Molecular diagnostics for the clinical laboratorian**. Totowa NJ, Humana Press, p.149–160, 2005.
- EADS, C.A. et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. **Cancer Res.**, v.Apr15;61(8), p.3410-8, 2001.
- EDWARDS, C.A.; FERGUSON-SMITH, A.C. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. **Curr.Opin.Cell Biol.** 19, 281-289, 2007.
- ELKIN, M. et al. The expression of the imprinted *H19* and *IGF2* genes in human bladder carcinoma. **FEBS Letters**, v.374, p.57-61, 1995.
- ENOKIDA, H; NAKAGAWA, M. Epigenetics in Bladder Cancer. **Int. J. Clin Oncol**, 13:298-307, 2008.
- EPSTEIN, J.I. et al. 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**, v.22, p.1435-1448, 1998.
- ESTEVEZ, L.I et al. H19-DMR allele-specific methylation analysis reveals epigenetic heterogeneity of CTCF binding site 6 but not of site 5 in head-and-neck carcinomas: a pilot case-control analysis. **Int J Mol Med**. 17: 397-404, 2006.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, 8:186-194, 1998.
- FEIL, R.; KHOSLA, S. Genomic *imprinting* in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation? **Trends Genet**, v.15, p.431-435, 1999.
- FEINBERG, A.P. *Imprinting* of a genomic domain of 11p15 and loss of *imprinting* in cancer: an introduction. **Cancer Res**, v.59, p.1743s-1746s, 1999.
- FREVEL, M.A.; SOWERBY, S.J.; PETERSEN, G.B.; REEVE, A.E. Methylation sequencing analysis refines the region of H19 epimutation in Wilms' tumor. **J Biol Chem** 274: 29331-29340, 1999.
- GABORY, A. et al. The *H19* gene: regulation and function of a non-coding RNA. **Cytogenet Genome Res**, v.113, p.188-193, 2006.
- GALLAGHER, D.J.; MILOWSKY, M.I. Bladder cancer. **Curr Treat Options Oncol**. v.Aug;10(3-4), p.205-215, 2009.
- HAMAJIMA, M. PCR-CTPP a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology. **Expert Rev Mol Diagn**, v.1, p.119-123, 2001.
- HAN, L.; WITMER, P.D.; CASEY, E.; VALLE, D.; SUKUMAR, S. DNA Methylation regulates microRNA expression. **Cancer Biol Ther.**, Aug;6(8):1284-8, 2007.

- HAO, Y. et al. Tumor suppressor activity of *H19* RNA. **Nature**, v.365, p.764-767, 1993.
- HARK, A.T. et al. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the *H19/IGF2* locus. **Nature**, v.405, p.486-489, 2000.
- HATTERMANN, K.; MEHDORN, H.M.; MENTLEIN, R.; SCHULTKA, S.; HELDFEINDT, J. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O⁶-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. **Analytical Biochemistry** 377, 62–71, 2008.
- HOQUE, M.O.; BEGUM, S.; TOPALOGLU, O.; CHATTERJEE, A.; ROSENBAUM, E.; CRIKINGE, W. V.; WESTRA, W.H.; SCHOENBERG, M.; ZAHURAK, M.; GOODMAN, S.N.; SIDRANSKY, D. Quantitation of Promoter Methylation of Multiple Genes in Urine DNA and Bladder Cancer Detection. **Journal of the National Cancer Institute**, Vol. 98, No. 14, July 19, 2006.
- HOFFMAN, A.R.; VU, T.H. Genomic *imprinting*. **Sci Med**, v.Jan/Feb, p.53–61, 1996.
- INCA, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/bexiga>. Acessado em 27/04/2010.
- ISHIHARA, K. ET AL. Comparative genomic sequencing identifies novel tissue-specific enhancers and sequence elements for methylation-sensitive factors implicated in *IGF2/H19* *imprinting*. **Genetics Res**, v.10, p.664-671, 2000.
- JEMAL, A. ET AL. Cancer statistics. **CA: Cancer J Clin**, v.58, p.71–76, 2008.
- JOYCE, J.A. et al. *Imprinting* of *IGF2* and *H19*: lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome. **Hum Mol Genet**, v.6, p.1543-1548, 1997.
- KANDURI, C. et al. The 5' flank of mouse *H19* in an unusual chromatin conformation unidirectionally blocks enhancer-promoter communication. **Curr Biol**, v.10, p.449-457, 2000.
- KANEDA, A.; FEINBERG, A.P. Loss of *imprinting* of *IGF2*: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. **Cancer Res**, v.65, p.11236-11240, 2005.
- KAUFMAN, D.S.; SHIPLEY, W.U.; FELDMAN, A.S. Bladder cancer. **Lancet**. v.Jul. 18;374(9685), p.239-249, 2009.
- KIM, V.N. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. **Mol Cells**. v.Feb 28;19(1), p.1-15, 2005.
- KIRKALI, Z. et al. Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. **Urology**, v.66, p.4-34, 2005.
- KRISTENSEN, L.S.; MIKESKA, T.; KRYPUY, M.; DOBROVIC, A. Sensitive Melting Analysis after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. **Nucleic Acids Research**, Vol. 36, No. 7, 2008.

- LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** v.3(4), p.253-266, 2003.
- LASSNER, M. Synthesis of cDNA, in Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction. Nonradioactive Methods, Berlin, Springer Labor Manual, 1995.
- LEE, Y.S.; DUTTA, A. MicroRNAs in Cancer. **Annu Rev Pathol** v.Sep 25, 2008.
- LI, E. ET AL. DNA methylation, genomic *imprinting*, and mammalian development. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v.58, p.297-305, 1993.
- LO, Y.M. ET AL. Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. **Cancer Res**, v.59(16), p.3899-903, 1999.
- LU, J. ET AL. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v.Jun 9;435(7043), p.834-838, 2005.
- LUJAMBIO, A. et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. **Cancer Res.**, v.Feb 15;67(4), p.1424-9, 2007.
- MCDOUGAL, W.S. et al. Cancer of the bladder, ureter, and renal pelvis. In: DeVita, V.T.; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. (eds). **CANCER: Principles and practice of oncology, 8th edn**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins: 1358–1384, 2008.
- OHLSSON, R.; RENKAWITZ, R.; LOBANENKOV, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. **Trends Genet**, v.17. p.520-527, 2001.
- PAULIN, R. et al. Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA. **Nucleic Acids Res**. v.26, p.5009-5010,1998.
- PETERS, J.; ROBSON, J.E. Imprinted noncoding RNAs. **Mamm Genome**, v.Aug;19(7-8), p.493-502, 2008.
- PETERSON, K.; SAPIENZA, C. *Imprinting* the genome: imprinted genes, *imprinting* genes, and a hypothesis for their interaction. **Annu Rev Genet**, v.27, p.7-31, 1993.
- POMPEO, A.C.L. et al. **Projeto Diretrizes: Câncer de bexiga – parte I**. Sociedade Brasileira de Urologia e Sociedade Brasileira de Patologia, 2006.
- RAINER, S; JOHNSON, L.A; DODRY, C.J; PING; A.J; GRUNDY, P.E; FEINBERG A.P. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**, 362:747–749,1993.
- RAINHO, C.A.; ESTEVES, L.I.C.V.; ROGATTO, S.R. Mecanismos Epigenéticos do Câncer. IN: FERREIRA, C. G; ROCHA, J.C. (Eds) **Oncologia Molecular**. Cidade: Atheneu, p. 87, 2004.

- RANDHAWA, G.S. et al. Loss of *imprinting* in disease progression in chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v.91, p.3144-3147, 1998.
- REIK, W.; MURREL, A. Genomic *imprinting*, silence across the border. **Nature**, v.405, p.408-409, 2000.
- REIK, W.; WALTER, J. Genomic *imprinting*: parental influence on the genome. **Nature Reviews**, vol 2, 2001.
- ROUHI, A, et al. MiRNAs, epigenetics, and cancer. **Mamm Genome**, v.Aug;19 (7-8), p.517-25, 2008.
- SALOZHIN, S.V.; PROKHORCHUK, E.B.; GEORGIEV, G.P. Methylation of DNA – one of the major epigenetic markers. **Biochemistry**, v.20, p.525-532, 2005.
- SANDOVICI, I.; LEPPERT, M.; HAWK, P.R.; SUAREZ, A.; LINARES, Y.; SAPIENZA, C. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions. **Hum Mol Genet** 12: 1569-1578, 2003.
- SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 17:914-921, 1994.
- SARKIS, A S; ARAP, M. A. Câncer de bexiga. IN: FERREIRA, C. G; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular**. Cidade: Atheneu, p.213, 2004.
- SASAMOTO, H. et al. Allele-specific methylation on upstream promoter region of *H19* by methylation-specific PCR with confronting two-pair *primers*. **Int J Oncol**, v.25, p.1273-8, 2004.
- SIMPSON, D.A.C. et al. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: a versatile approach to quantitative PCR. **Mol. Vision**, v.6, p.178-183, 2000.
- SHARIAT, S.H.; KARAM, J.A.; LERNER, S.P. Molecular markers in bladder cancer. **Current Opinion in Urology**, 18:1–8, 2008.
- TAKAI, D. et al. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human *H19* promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. **Human Molecular Genetics** 23, v.10, p.2619-2626, 2001.
- TAM, W. The emergent role of microRNAs in molecular diagnostics of cancer. **J Mol Diagn**, v.Sep;10(5), p.411-414, 2008.
- THORVALDSEN, J.L.; DURAN, K.L.; BARTOLOMEI, M.S. Deletion of the *H19* differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of *H19* and *Igf2*. **Genes Dev**, v.12, p.3693-3702, 1998.
- TYCKO, B. Epigenetic gene silencing in cancer. **J Clin Invest** 105:401-407, 2000.

- VAISSIÈRE, T.; SAWAN, C.; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutat Res.** v.Jul-Aug;659(1-2), p.40-48, 2008.
- VAN RHIJN, B.W.; VAN DER POEL, H.G.; VAN DER KWAST, T.H. Urine markers for bladder cancer surveillance: a systematic review. **Eur Urology**, v.47, p.736-748, 2005.
- VERHAEGH, G.W.; VERKLEIJ, L.; VERMEULEN, S.H.; DEN HEIJER, M.; WITJES, J.A.; KIEMENEY, L.A. Polymorphisms in the H19 gene and the risk of bladder cancer. **Eur Urol.**, Nov;54(5):1118-26, 2008.
- VERMA, M.; DUNN, B.K.; ROSS, S. et al.: Early detection and risk assessment. **Ann NY Acad Sci** 983: 298-319, 2003.
- VU, T.H.; LI, T.; NGUYEN, D.; NGUYEN, B.T.; YAO, X.M.; HU, J.F.; HOFFMAN AR: Symmetric and asymmetric DNA methylation in the human IGF2-H19 imprinted region. **Genomics** 64: 132-143, 2000.
- WEKSBERG, R. et al. Disruption of insulin-like growth factor 2 *imprinting* in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nat Genet**, v.5, p.143-149, 1993.
- WOJDACZ, T.K.; DOBROVIC, A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. **Nucleic Acids Res**, v.35(6), p.e41, 2007.
- WOJDACZ, T.K.; DOBROVIC, A.; ALGAR, E.M. Rapid detection of methylation change at *H19* in human *imprinting* disorders using methylation-sensitive high-resolution melting. **Hum Mutat** v.Oct 29(10), p.1255-1260, 2008.
- YANG, N.; COUKOS, G.; ZHANG, L. MicroRNA epigenetic alterations in human cancer: one step forward in diagnosis and treatment. **Int J Cancer**, v.Mar1 122(5), p.963-968, 2008.
- ZHANG, Y.; TYCKO, B. Monoallelic expression of the human *H19* gene. **Nat Genet**, v.1, p.40-44, 1992.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I. Dados de identificação do voluntário ou responsável legal**

Nome do Voluntário _____

Documento identidade nº _____ Sexo [] M [] F

Endereço _____ nº _____ Apto. _____

Bairro _____ CEP _____

Cidade _____ Estado _____

Telefone (____) _____

II. Dados sobre o estudo

Título: Avaliação do padrão de metilação da DMR (Differentially Methylated Region) dos genes IGF2 e H19 em carcinomas uroteliais

Pesquisador: Priscila Maria Manzini Ramos

Cargo: pós-graduação – nível mestrado

Pesquisador: Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho

Departamento: Genética

III. Explicações do pesquisador ao voluntário ou representante legal

1. Justificativas e Objetivos da Pesquisa: O Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu - SP e seus colaboradores (pesquisadores e médicos) desenvolvem pesquisas para obter um maior conhecimento dos tumores de bexiga. Por meio destas pesquisas é possível conhecer melhor a doença e, desta forma, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Estas pesquisas exigem material a fresco, proveniente das lesões obtidas no momento da cirurgia, para que seja possível a análise destas células em laboratório.

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. As análises são realizadas em etapas e o fragmento de tecido coletado será utilizado no laboratório por códigos de números preservando assim sua identidade, e armazenado num banco de amostras exclusivas para estas pesquisas.

Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional, 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 armazenado, 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

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, consinto em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa.

Botucatu, de de 2008.

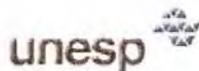
Assinatura do paciente ou
responsável legal

Assinatura do pesquisador

Priscila Maria Manzini Ramos
Departamento de Genética – IBB
Distrito de Rubião Jr s/n
Botucatu – SP
CEP 18618-000
Fone: 14-38116229
e-mail: primanzini@yahoo.com.br

Orientador:
Cláudia Aparecida Rainho
Endereço: Rua Fausto Lyra Brandão, 211 apto 14
Vila São Judas Tadeu
Botucatu – SP CEP 18606-790
Fone: 14 - 38146575
e-mail: rainho@ibb.unesp.br

ANEXO 2



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, 05 de maio de 2008

Of. 165/08-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^a Dr^a Claudia Aparecida Rainho
Departamento de Genética do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Dr^a Cláudia,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Avaliação do padrão de metilação da DMR (Differenatially Methylated Region) dos genes IGF₂ e H₁₉ em carcionomas uroteliais" a ser conduzida por Priscila Maria Manzini Ramos orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 05 de maio de 2.008, sem necessidade de envio à CONEP, pois cumpre a Resolução 340-2004 - Genética Humana.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

ANEXO 3

Anexo 3. Quantidade de alelos metilados no DNA tumoral comparado ao DNA normal adjacente ao tumor
H19 metilado

referência	médias CT ACTB pool		desvio ACTB		médias CT M pool		desvio M		ΔCT	$2^{\Delta(-\Delta CT)}$
	média CT	ACTB	média CT	M	média CT	M	ΔCT	M		
01N	24,93591118	24,93591118	26,30456924	26,30456924	1,368658066	1,368658066	1,078152	1,078152	0,473634994	0,473634994
01T	27,18811035	27,18811035	28,53282928	28,53282928	1,344718933	1,344718933	1,054213	1,054213	0,481559749	0,481559749
02N	32,28599167	32,28599167	32,8981514	32,8981514	0,612159729	0,612159729	0,321654	0,321654	0,80015196	0,80015196
02T	28,55014992	28,55014992	27,74290466	27,74290466	-0,807245255	-0,807245255	-1,09775	-1,09775	2,140207834	2,140207834
05N	29,34648705	29,34648705	29,89637756	29,89637756	0,549890518	0,549890518	0,259385	0,259385	0,835444056	0,835444056
05T	30,96525574	30,96525574	29,76591492	29,76591492	-1,19934082	-1,19934082	-1,48985	-1,48985	2,808590845	2,808590845
09N	24,48981285	24,48981285	26,00438499	26,00438499	1,514572144	1,514572144	1,224066	1,224066	0,428074411	0,428074411
09T	34,46743774	34,46743774	32,21303177	32,21303177	-2,254405975	-2,254405975	-2,54491	-2,54491	5,835723881	5,835723881
12N	25,9359436	25,9359436	26,22185326	26,22185326	0,285909653	0,285909653	-0,0046	-0,0046	1,003190781	1,003190781
12T	29,54733086	29,54733086	27,52446938	27,52446938	-2,022861481	-2,022861481	-2,31337	-2,31337	4,970417809	4,970417809
14N	25,88097191	25,88097191	25,41320801	25,41320801	-0,467763901	-0,467763901	-0,75827	-0,75827	1,691460573	1,691460573

14T	33,74126434	31,93524742	-1,806016922	-2,09652	4,276772808
15N	26,27095032	27,51561928	1,244668961	0,954163	0,516140837
15T	29,86769295	28,92674446	-0,940948486	-1,23145	2,348035359
16N	26,13201904	27,48273277	1,35071373	1,060208	0,479562887
16T	26,97883606	28,35259056	1,373754501	1,083249	0,471964792
21N	28,68920708	28,75978279	0,070575714	-0,21993	1,164677021
21T	26,07735634	27,559515	1,482158661	1,191653	0,437800949
31N	26,83166504	27,79502106	0,963356018	0,67285	0,627266156
31T	28,27305412	27,55874634	-0,714307785	-1,00481	2,006683979
08N	24,70056152	26,2809391	1,580377579	1,289872	0,408987334
08T	33,65542603	33,80752563	0,152099609	-0,13841	1,100688348
17N	26,59922218	27,71624756	1,117025375	0,82652	0,563887893
17T	29,58478355	28,99944115	-0,585342407	-0,87585	1,835086483
29N	27,90865135	27,22079659	-0,687854767	-0,97836	1,970225027
29T	29,93271637	27,56036377	-2,3723526	-2,66286	6,332864661
30N	29,6350193	27,54590797	-2,08911328	-2,37962	5,203985622
30T	34,76831055	29,53942871	-5,228881836	-5,51939	45,8670903

32N	28,79719734	26,55576134	-2,241436005	-2,53194	5,78349527
32T	31,47121429	27,64082336	-3,83039093	-4,1209	17,39856697
33N	27,23309135	26,80343628	-0,429655075	-0,72016	1,647365549
33T	29,69716072	27,85307503	-1,844085693	-2,13459	4,391127246
65N	27,06542778	26,29858208	-0,766845703	-1,05735	2,0811073
65T	33,02963638	31,85372162	-1,175914764	-1,46642	2,763354042
18N	25,27042389	25,4932766	0,222852707	-0,06765	1,048010333
18T	25,73858452	25,99646187	0,25787735	-0,03263	1,022873898
19N	27,51694679	28,98826408	1,471317291	1,180812	0,441103269
19T	27,03436852	28,91816902	1,883800507	1,593295	0,331413699
23N	25,71576881	27,49772453	1,781955719	1,49145	0,355654896
23T	26,00270653	27,97257996	1,969873428	1,679368	0,312219428
24N	29,2981739	27,19201088	-2,106163025	-2,39667	5,265858201
24T	34,77147293	27,49536324	-7,276109695	-7,56662	189,5737426
28N	27,7087326	25,50545692	-2,203275681	-2,49378	5,632523113
28T	30,88929939	26,45031929	-4,438980103	-4,72949	26,52876759
03N	31,38930702	29,97441292	-1,414894104	-1,7054	3,261192838

03T	26,21224976	25,86961555	-0,342634201	-0,63314	1,550936747
04N	29,16673851	29,66713715	0,500398636	0,209893	0,864601361
04T	25,95864677	26,76924324	0,810596466	0,520091	0,697327935
22N	28,46656609	29,55423737	1,08767128	0,797166	0,575478673
22T	26,22107887	27,47042656	1,249347687	0,958842	0,51446968
36N	23,83307838	25,6804657	1,847387314	1,556882	0,339884938
36T	29,60785866	29,83831024	0,230451584	-0,06005	1,042504827
11N	26,74132538	27,85290337	1,111577988	0,821072	0,566021069
11T	31,54905128	30,1067791	-1,442272186	-1,73278	3,323671583
35N	28,79920959	29,59746361	0,798254013	0,507748	0,703319262
35T	31,88237762	30,72162056	-1,160757065	-1,45126	2,734472802
37N	25,79043388	27,64053917	1,850105286	1,5596	0,339245213
37T	31,92938232	31,38746643	-0,541915894	-0,83242	1,780671686
41N	27,5195713	29,53569603	2,016124725	1,725619	0,302368744
41T	32,80913544	30,70342445	-2,105710983	-2,39622	5,2642085
42N	26,8822937	27,73513222	0,852838516	0,562333	0,677206221
42T	31,19718742	31,11203575	-0,085151672	-0,37566	1,297430555

49N	26,73476982	27,66288185	0,92811203	0,637606	0,642778517
49T	31,51813316	29,81843758	-1,699695587	-1,9902	3,972924109
50N	26,75292015	23,88456726	-2,86835289	-3,15886	8,931227911
50T	31,67167854	25,50418091	-6,167497635	-6,458	87,91291899
55N	29,65909576	26,3978138	-3,261281967	-3,55179	11,72720752
55T	27,76673126	25,21844482	-2,548286438	-2,83879	7,154208111
57N	28,17528725	29,22976685	1,054479599	0,763974	0,588872027
57T	26,87323952	28,40200996	1,528770447	1,238265	0,423882174
58N	28,71478844	29,75505066	1,040262222	0,749757	0,594703893
58T	33,76739502	31,85036278	-1,917032242	-2,20754	4,618863431
59N	26,82800865	26,18732643	-0,64068222	-0,93119	1,906845385
59T	35,44714355	34,75273895	-0,694404602	-0,98491	1,979190184
60N	28,58117104	27,66421509	-0,916955948	-1,20746	2,309309589
60T	27,80316353	26,67027855	-1,132884979	-1,42339	2,68215131
61N	26,23875427	26,41757202	0,178817749	-0,11169	1,080491632
61T	29,9779892	28,19486046	-1,783128738	-2,07363	4,209457706
69N	26,91888237	26,9979248	0,079042435	-0,21146	1,157861918

69T	30,31229973	29,69186974	-0,620429993	-0,91094	1,880264524
AMOSTRAS NÃO PAREADAS					
13T	27,95561981	25,70239258	-2,253227234	-2,54373	5,830957801
06T	30,96824074	31,53453636	0,566295624	0,27579	0,825997903
07T	28,97592163	28,98207092	0,006149292	-0,28436	1,217866803
10N	27,08388329	27,46946144	0,385578156	0,095073	0,936225193
10T	34,02540588	31,73832703	-2,287078857	-2,57758	5,969394107
20T	30,91849518	29,83084106	-1,087654114	-1,37816	2,599365959
26T	30,90618896	30,22773743	-0,678451538	-0,96896	1,957425211
27T	31,97141457	27,79837036	-4,173044205	-4,46355	22,06288965
40T	25,36473083	27,51137543	2,146644592	1,856139	0,276214518
46T	25,4006176	27,20731163	1,8066694031	1,516188	0,349608367
64T	36,37553406	32,52227783	-3,853256226	-4,14376	17,67651389
68T	27,30797768	28,16423607	0,856258392	0,565753	0,675660282
71T	33,00372314	36,16760254	3,163879395	2,873374	0,13646721

H19 não metilado						
referência	média CT ACTB pool	desvio ACTB	média CT U pool	desvio M	Δ CT ref	
	25,9198614	1,35607	26,19146403	1,483038	0,271602631	
	ACTB média ct	U média ct	Δ CT U	Δ ACT	$2^{\wedge}-(\Delta\Delta$ CT)	
01N	24,93591118	25,27476311	0,338851929	0,067249298	0,954445607	
01T	27,18811035	27,77669716	0,588586807	0,316984176	0,802746193	
02N	32,28599167	34,76107788	2,475086212	2,203483581	0,217112759	
02T	28,55014992	28,28452301	-0,265626907	-0,53722954	1,451183078	
05N	29,34648705	31,12922096	1,782733917	1,511131286	0,350836004	
05T	30,96525574	31,73738289	0,772127151	0,50052452	0,706849745	
09N	24,48981285	25,33785057	0,84803772	0,576435089	0,670618836	
09T	34,46743774	35,69592285	1,228485107	0,956882476	0,515168941	
12N	25,9359436	28,0118618	2,075918198	1,804315567	0,28631684	
12T	29,54733086	30,81797791	1,270647049	0,999044418	0,500331289	
14N	25,88097191	27,30305672	1,422084808	1,150482177	0,450474649	
14T	33,74126434	36,06602478	2,324760437	2,053157806	0,240956094	
15N	26,27095032	24,51570129	-1,755249023	-2,02685165	4,075145737	

15T	29,86769295	29,09393501	-0,773757935	-1,04536057	2,06388211
16N	26,13201904	24,62323761	-1,508781433	-1,78038406	3,435176112
16T	26,97883606	25,83476448	-1,144071579	-1,41567421	2,667843818
21N	28,68920708	30,67047882	1,981271744	1,709669113	0,305730182
21T	26,07735634	27,40561104	1,3282547	1,056652069	0,480746391
31N	26,83166504	28,00012016	1,168455124	0,896852493	0,537057144
31T	28,27305412	30,23690224	1,963848114	1,692245483	0,3094444914
08N	24,70056152	25,65423012	0,953668594	0,682065963	0,623272099
08T	33,65542603	35,91275406	2,257328033	1,985725402	0,252485877
17N	26,59922218	28,68327522	2,08405304	1,812450409	0,284706945
17T	29,58478355	31,10300636	1,5182222809	1,246620178	0,421434352
29N	27,90865135	28,16711426	0,258462906	-0,01313973	1,009149365
29T	29,93271637	29,94092369	0,008207321	-0,26339531	1,200300229
30N	29,6350193	30,15517235	0,520153046	0,248550415	0,841741752
30T	34,76831055	34,21004868	-0,558261871	-0,8298645	1,77751841
32N	28,79719734	29,05694008	0,259742737	-0,01185989	1,008254535
32T	31,47121429	31,02075005	-0,450464249	-0,72206688	1,649543564

33N	27,23309135	27,57474709	0,341655731	0,0700531	0,952602936
33T	29,69716072	32,68906021	2,99189949	2,720296859	0,151743134
65N	27,06542778	27,25055695	0,185129166	-0,08647347	1,0617771605
65T	33,02963638	34,41517258	1,385536194	1,113933563	0,4620325663
18N	25,27042389	26,3618927	1,091468811	0,81986618	0,5664944487
18T	25,73858452	26,7955265	1,056941986	0,785339355	0,580215461
19N	27,51694679	28,8361969	1,319250107	1,047647476	0,483756357
19T	27,03436852	28,76821709	1,733848572	1,462245941	0,362927695
23N	25,71576881	27,36567116	1,649902344	1,378299713	0,384671883
23T	26,00270653	27,5864563	1,583749771	1,31214714	0,40272107
24N	29,2981739	30,56236839	1,264194489	0,992591858	0,50257407
24T	34,77147293	32,25276184	-2,51871109	-2,79031372	6,917801997
28N	27,7087326	27,7847805	0,076047897	-0,19555473	1,145164405
28T	30,88929939	29,78875732	-1,100542068	-1,3721447	2,588550923
03N	31,38930702	31,95629311	0,566986084	0,295383453	0,814855724
03T	26,21224976	26,54547882	0,333229065	0,061626434	0,958183295
04N	29,16673851	30,26610756	1,099369049	0,827766418	0,563400825

04T	25,95864677	27,02724266	1,068595886	0,796993255	0,575547436
22N	28,46656609	28,99537849	0,528812408	0,257209777	0,836704571
22T	26,22107887	26,71682167	0,495742798	0,224140167	0,856105105
36N	23,83307838	25,46782112	1,634742737	1,363140106	0,388735264
36T	29,60785866	31,93373871	2,325880051	2,05427742	0,240769171
11N	26,74132538	27,6182766	0,876951218	0,605348587	0,65731254
11T	31,54905128	31,68774605	0,138694763	-0,13290787	1,096501562
35N	28,79920959	29,4974308	0,698221207	0,426618576	0,744003557
35T	31,88237762	32,84152603	0,959148407	0,687545776	0,620909205
37N	25,79043388	26,77639198	0,985958099	0,714355468	0,609477358
37T	31,92938232	33,13314819	1,203765869	0,932163238	0,524071937
41N	27,5195713	28,73034668	1,210775375	0,939172744	0,521531846
41T	32,80913544	33,49383163	0,684696198	0,413093567	0,751011255
42N	26,8822937	27,72578239	0,843488693	0,571886062	0,672736732
42T	31,19718742	31,69491005	0,497722626	0,226119995	0,854931067
49N	26,73476982	27,24166107	0,506891251	0,23528862	0,849515032
49T	31,51813316	30,94388008	-0,574253082	-0,84585571	1,79733049

50N	26,75292015	26,91951752	0,166597366	-0,10500526	1,075498315
50T	31,67167854	32,30055618	0,62887764	0,357275009	0,780637672
55N	29,65909576	29,90480042	0,245704651	-0,02589798	1,018113202
55T	27,76673126	27,9456768	0,178945541	-0,09265709	1,066332297
57N	28,17528725	29,16947937	0,994192123	0,722589492	0,606008741
57T	26,87323952	28,03823853	1,164999008	0,893396377	0,538345259
58N	28,71478844	29,59471703	0,879928589	0,608325958	0,655957406
58T	33,76739502	34,19417953	0,426784515	0,155181884	0,89801915
59N	26,82800865	27,26592445	0,437915802	0,166313171	0,891117037
59T	35,44714355	35,68941498	0,242271423	-0,02933121	1,020538923
60N	28,58117104	28,74489784	0,163726807	-0,10787582	1,077640386
60T	27,80316353	27,9366703	0,133506775	-0,13809586	1,100451724
61N	26,23875427	26,58139992	0,342645645	0,071043014	0,951949526
61T	29,9779892	30,34660149	0,368612289	0,097009658	0,934968938
69N	26,91888237	27,08810425	0,169221878	-0,10238075	1,073543576
69T	30,31229973	31,77189064	1,459590912	1,187988281	0,438914464

AMOSTRAS NÃO PAREADAS					
13T	27,95561981	29,25242043	1,296800613	1,025197982	0,491342867
06T	30,96824074	29,9237442	-1,044496536	-1,31609917	2,489919616
46T	25,4006176	26,14989662	0,749279022	0,477676391	0,718133321
68T	27,30797768	27,78174782	0,473770142	0,202167511	0,869243627
71T	33,00372314	32,85910416	-0,144618988	-0,41622162	1,334428142
20T	30,91849518	32,32933426	1,410839081	1,13923645	0,453999795
40T	25,36473083	26,77458191	1,409851074	1,138248443	0,454310816
10N	27,08388329	28,74556541	1,661682129	1,390079498	0,381543777
10T	34,02540588				
07T	28,97592163	29,05449104	0,078569412	-0,19303322	1,143164657
26T	30,90618896	34,22710419	3,320915222	3,049312591	0,120799585
27T	31,97141457	34,04960632	2,078191757	1,806589126	0,285865986
64T	36,37553406	35,26879501	-1,106739044	-1,37834168	2,599693741