



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-Graduação em Genética

Marina Curado Valsechi

***Avaliação de Candidatos a Marcadores
Moleculares Envolvidos no Carcinoma
Renal de Células Claras***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Genética, para obtenção do
Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Peitl Júnior

São José do Rio Preto-SP

Fevereiro de 2009

Valsechi, Marina Curado.

Avaliação de candidatos a marcadores moleculares envolvidos no
Carcinoma Renal de Células Claras / Marina Curado Valsechi. - São José
do Rio Preto : [s.n.], 2009.

130 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Paula Rahal

Co-orientador : Paulo Peitl Júnior

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Rins – Câncer. 2. Carcinoma renal de células claras. 3. Expressão
gênica. 4. Metilação do DNA. I. Rahal, Paula. II. Peitl Júnior, Paulo.
III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. IV. Título

CDU – 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Marina Curado Valsechi

***Avaliação de Candidatos a Marcadores
Moleculares Envolvidos no Carcinoma
Renal de Células Claras***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

São José do Rio Preto, ____/____/2009

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, SP, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedico este trabalho...

**...Aos meus pais Linoel e Elza, que são um exemplo de força de vida,
meu porto seguro, os responsáveis pela minha vida e por tudo o que
eu sou hoje.**

“Quando eu estou aqui
Eu vivo esse momento lindo
Olhando pra vocês
E as mesmas emoções sentindo
São tantas já vividas
São momentos que eu não esqueci
Detalhes de uma vida
Histórias que eu contei aqui...”

Dedico também,

...Aos meus irmãos, Marília e Linoel, meus amigos eternos, que sempre me apoiaram e estiveram do meu lado me dando força.

“Pressure pushing down on me
Pressing down on you no man ask for
Under pressure - that burns a building down
Splits a family in two
Puts people on streets
that's o.k.
It's the terror of knowing
What the world is about
Watching some good friends
Screaming 'Let me out'
Pray tomorrow - gets me higher
Pressure on people - people on streets...”

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Paula Rahal, pela amizade, apoio, conselhos, incentivo e confiança a mim depositada. Agradeço pela oportunidade que tive de trabalharmos juntas, pelo conhecimento e aprendizado durante esses anos. Obrigada por acreditar e confiar em mim, me incentivar, e por me fazer acreditar que eu sou capaz. Obrigada por me mostrar ao maravilhoso e interessante mundo da pesquisa científica. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Peitl Júnior, pela amizade, conselhos, por sempre estar disposto a me ajudar e por acreditar em minha capacidade. Obrigada pelas palavras amigas e pelas horas de lazer, que sempre foram muito divertidas. Obrigada por fazer parte do meu trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto, minha orientadora durante minha iniciação científica, pela amizade, apoio e incentivo à pesquisa. Obrigada pelo conhecimento e pela sua confiança.

Ao Dr. Daniel Seabra e toda a equipe do Departamento de Urologia do Hospital de Câncer de Barretos, pela atenção e colaboração na coleta das amostras, e por acreditarem no meu trabalho.

À Dra. Lígia Maria Kerr, patologista do Hospital de Câncer de Barretos, pela contribuição nas análises histopatológicas das amostras.

À Tamara e ao Tasso, funcionários do Banco de Tumores do Hospital de Câncer de Barretos, pelo auxílio e disponibilidade em separar as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos Pacientes portadores de carcinoma renal de células claras, pela disponibilidade de serem incluídos neste trabalho, pois sem eles seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio Cordeiro, Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva, FAMERP, pela disponibilidade e colaboração nas análises estatísticas.

Ao Ricardo Pereira de Moura e à Dra. Anamaria Camargo, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pela disponibilidade em me receberem e pelo auxílio com a parte final desse trabalho.

À Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, pelos ensinamentos, apoio, palavras de amizade, conselhos, atenção sempre dedicados e por acreditar em mim e no meu trabalho.

Aos Professores do Departamento de Biologia e da Pós-Graduação em Genética, pela minha formação acadêmica, pelos ensinamentos e conhecimentos, atenção, colaboração em todos os momentos que precisei e confiança.

À coordenadora e a vice-coordenadora do Programa de Pós Graduação, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingues e Profa. Dra. Lílian Madi-Ravazzi, pela atenção e disponibilidade nos problemas burocráticos e preocupação constante na nossa formação acadêmica.

Aos membros do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Genética, pela preocupação em auxiliar e atender os alunos, bem como pela disponibilidade para melhorar cada vez mais o nosso programa.

Aos Membros da banca examinadora , Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, Profa. Dra. Agnes Cristina Fett-Conte, Prof. Dr. Wilson Araujo da Silva Júnior, pelo aceite do convite e disponibilidade em ler e contribuir com meu trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, especialmente a Rosemar, Rosana e Sílvia, pela disponibilidade, auxílio e colaboração nos diversos problemas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro e iniciativa em incentivar as pesquisas no Brasil.

Ao Rodrigo Vieira Rodrigues pela paciência e disponibilidade em me auxiliar e tirar minhas dúvidas.

À Lenira, pelo apoio, amizade, conselhos e disponibilidade em ajudar todos os momentos que precisei e bati em sua porta.

À Jucimara Colombo pelo apoio e amizade, pela companhia, incentivo, e por sempre me ajudar quando necessário.

À Carol Jardim, Carol Pacca e Cíntia, pelo apoio, amizade, incentivo, e por me auxiliarem sempre que necessário. E é claro, pela companhia nas baladas. Obrigada meninas!

À Marília, pela amizade, apoio, conselhos, incentivo e por me ajudar nos momentos difíceis, mesmo sendo só pelo msn ou por e-mail. Mesmo de longe ela se desdobrava para me ajudar, sempre se preocupando em saber como meu projeto estava andando. Muito obrigada por tudo Má, sem você me ajudando seria muito difícil.

À Paola, pela amizade, conhecimento, por me auxiliar em boa parte do meu trabalho, pelos valiosos conselhos, pela disponibilidade em me ouvir sempre que precisava, por me apoiar, me incentivar nesta carreira e por torcer por mim.

À minha grande amiga Erica, que sempre me ajudou, desde quando me orientou durante o estágio básico e até hoje, no mestrado. Obrigada pela sua amizade, pelo seu carinho, compreensão, por estar comigo nos piores e nos melhores momentos da minha vida. Por me incentivar na carreira científica, torcer e me apoiar sempre, pelos momentos de lazer e diversão, e até mesmo pelas “brincas”, que me mostravam a realidade e me fizeram crescer. Obrigada por acreditar e confiar em mim.

À minha amiga Lilian Pires, pela amizade, preocupação, por me ajudar em qualquer coisa que precisei. Pelo incentivo, por acreditar em no meu potencial e na minha capacidade, pelo apoio nas horas difíceis, e por estar ao meu lado nas horas de lazer, como nas baladas durante a semana. Pela disponibilidade em ler e me auxiliar neste trabalho.

Ao meu amigo Marcelo, que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pela amizade, apoio, incentivo, por torcer e acreditar em mim. Pelas horas de estudo na biblioteca, antes da prova do mestrado, que foram muito importantes, e valeram à pena.

Ao meu amigo Buxo, Sérgio, pela amizade, apoio, aprendizado e pelos momentos de lazer e diversão, que sempre foram muito bons.

Aos meus amigos Paulo Vitor, Carol Bonfim e Lilian (Myuki), pela amizade, incentivo e apoio nos momentos em que mais precisei. Por me ouvirem e me aconselharem sempre.

Aos estagiários André, Felipe, Valéria, Natália, Bianca, Ana Cláudia e Renata, que sempre me auxiliaram de uma forma ou de outra, neste trabalho.

À todos meus amigos da 48ª turma de Ciências Biológicas do Ibilce. Obrigada pelos quatro anos de convivência.

Aos alunos de pós-graduação, pelos momentos de companheirismo e alegria, que passamos juntos, especificamente Julcimary, Juliana, Márcia, Hederson.

À minha amiga e companheira Adriana, por estar sempre ao meu lado nos piores e nos melhores momentos de minha vida. Pela sua amizade, carinho, compreensão, pelo seu apoio e por sempre estar disposta em me ajudar em tudo o que precisei, mesmo estando longe. Obrigada por confiar em mim e no meu potencial, por estar ao meu lado nos momentos de lazer, que foram tantos.

Aos meus grandes amigos Renan, Maria Carolina, Vivian e Vinícius, que mesmo não estando presente em todos os momentos, sempre me apoiaram e torceram pelo meu crescimento. Obrigada pela amizade, pelo apoio nas horas mais difíceis, e confiança.

Ao meu amigo Pierre, pela torcida, pelo apoio, carinho e amizade. Por acreditar no meu potencial e em minha capacidade.

Às minhas amigas Aline Cristina, Juliana Cândido, que sempre me apoiaram, estiveram ao meu lado, me incentivando. Pelas horas de lazer que passamos juntas, pelo carinho, amizade, por me ouvirem nas horas difíceis, sempre me aconselhando, e pela compreensão a mim depositados.

À Rafaela, Nathália e Ana Paula, que sempre torceram por mim e acreditaram no meu potencial.

Aos meus amigos Juliano e Talita, que durante muitos anos vêm me dando apoio e torcendo por mim. Obrigada pelo carinho, amizade, torcida e pelos momentos de descontração que passamos juntos, que foram de fundamental importância.

Aos meus familiares (Família Curado e Família Valsechi) que sempre me apoiaram, me incentivaram e torceram por mim e para meu crescimento pessoal e profissional. Especialmente à minha prima, Priscila, que sempre esteve ao meu lado, me auxiliando, dando conselhos, me ouvindo. Obrigada pelo carinho, amizade e por confiar e acreditar em mim.

Às minhas tias, Rosa e Céu, que sempre torceram e rezaram muito por mim. E sempre estiveram ao meu lado, nas piores e nas melhores horas de minha vida. Obrigada por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim.

Ao meu cunhado João Pedro, pela torcida, palavras de amizade, pelos conselhos e por acreditar em mim.

À minha irmã e amiga, Marília, pela sua amizade, carinho, compreensão. Pelas palavras de consolo, por estar ao meu lado sempre. Por me incentivar na carreira que escolhi, pela confiança e por acreditar no meu potencial e na minha capacidade. Obrigada pela disponibilidade em ler o meu trabalho, e pelas sugestões, sempre bem vindas. Obrigada por estar sempre comigo.

Ao meu grande irmão e amigo Linoel, com quem sempre pude contar e sempre me auxiliando quando necessário. Obrigada pela amizade, carinho, compreensão, pela força nos momentos difíceis de minha vida. Obrigada por me incentivar e torcer por mim e por sua preocupação.

Aos meus queridos e amados pais, Linoel e Elza, pelo amor, carinho e preocupação comigo. Pela minha educação, formação, dedicação, paciência. Obrigada por torcerem e acreditarem em meu potencial e em minha capacidade, pelos ensinamentos, por não me deixarem desistir frente às dificuldades, por estarem sempre ao meu lado, em todas as etapas da minha vida. Tudo o que sou hoje devo a vocês.

A Deus pela minha vida, pela pessoa que sou e por tudo que consegui até hoje.

“Existem sentimentos que palavras não explicam.

Que frases não justificam.

Que livros não argumentam...

Existem coisas que só o coração sabe como lidar...

E que o melhor bálsamo, sempre será o tempo.”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

O tumor renal é a mais letal das doenças urológicas. É uma doença histologicamente heterogênea, sendo o carcinoma renal de células claras o subtipo histológico mais comum. Embora a nefrectomia e imunoterapia sejam tratamentos bem estabelecidos, aproximadamente 30% dos pacientes tratados são acometidos por metástases. Alterações na expressão gênica e na inativação transcricional, devido ao mecanismo de metilação, são evidentes em células cancerosas. A metilação do DNA é um evento epigenético intimamente relacionado com o silenciamento da expressão gênica, e está envolvida em vários processos, dentre eles, a carcinogênese. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos investigar se os genes selecionados, *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23* apresentam expressão alterada nas amostras tumorais, verificar se a expressão gênica está associada com a progressão tumoral, e analisar o padrão de metilação de ilhas CpGs. Os quatro genes selecionados foram validados pela técnica de PCR em Tempo Real. Para validação desses genes foram utilizadas 35 amostras de carcinoma renal de células claras e 35 amostras de córtex renal normal. Os genes *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23* apresentaram redução de expressão significativa em amostras de carcinoma renal de células claras quando comparadas ao *pool* de amostras de córtex renal normal. Observou-se que a redução da expressão do gene *ADAM23* está diretamente

relacionada com o avanço do estadiamento tumoral. Foi observada uma frequência elevada de hipermetilação do gene *ADAM23*, entretanto, não houve associação do padrão de metilação com os dados clínicos. A análise da expressão gênica e dos mecanismos responsáveis pela inativação transcricional dos genes *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*, estudados pela primeira vez em carcinoma renal, e *GPC3*, podem fornecer informações relevantes para o conhecimento e desenvolvimento do carcinoma renal de células claras.

Palavras-chave: carcinoma renal de células claras, expressão gênica, metilação, *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*.

ABSTRACT

The renal tumor, which is the most lethal of urological diseases, is a histologically heterogeneous disease, and the clear cell renal cell carcinoma the most common histological subtype. Although the treatment of nephrectomy and immunotherapy are established, approximately 30% of patients are affected by metastases. Changes in gene expression and transcriptional inactivation, due to the methylation mechanism are evident in cancer cells. The DNA methylation is an epigenetic event closely related to the silencing of gene expression, and is involved in several cases, including the carcinogenesis. The aim of this study was to investigate the gene expression of *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* and *ADAM23*, check if gene expression was associated with tumor progression and analyze methylation pattern of CpG island. The four selected genes were validated by the quantitative RT-PCR. Thirty five samples of clear cell renal cell carcinoma and 35 samples of normal renal cortex were used for validation. The genes *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* and *ADAM23* showed significant reduction of expression in samples of clear cell renal cell carcinoma when compared to a pool of samples of normal renal cortex. It was observed that the lower expression of *ADAM23* is directly related to the advancement of the tumor staging. Despite the high frequency of hypermethylation of *ADAM23*, there was no association with the methylation pattern of the clinical data. The analysis of gene

expression and the mechanisms responsible for the transcriptional inactivation of genes *CRABP2*, *KTN1* and *ADAM23*, first studied in clear cell renal cell carcinoma, and *GPC3*, may provide relevant information for the clear cell renal cell carcinoma understanding and development.

Key-words: clear cell renal cell carcinoma, gene expression, methylation, *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM	do inglês <i>a desintegrin and metalloproteinase domain</i>
ADAM23	do inglês <i>ADAM metalloproteinase domain 23</i>
cDNA	do inglês <i>complementary DNA</i>
CGAP	do inglês <i>Cancer Genome Anatomy Project</i>
CpG	do inglês <i>cytosine phosphate guanine</i>
CRABP2	do inglês <i>cellular retinoic acid binding protein 2</i>
C_T	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
DEPC	do inglês <i>Di-etil pirocarbonato</i>
DNA	do inglês <i>acid desoxiribonucleic</i>
DNMT	do inglês <i>DNA methyltransferase</i>
GAPDH	do inglês <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GPC3	do inglês <i>glypican 3</i>
HAT	do inglês <i>histone acetyltransferase</i>
HDAC	do inglês <i>histone deacetylase</i>
HS	do inglês <i>heparin sulfate</i>
HSPG	do inglês <i>heparin sulfate proteoglycan</i>

H2H	do inglês <i>Hyper and Hypoexpressed genes</i>
KTN1	do inglês <i>kinectin 1 (kinesin receptor)</i>
Log	Logarítmo
Log2	Logarítmo na base 2
MBD	do inglês <i>Methyl-CpG-binding domain</i>
MSP	do inglês <i>Methylation-Specific Polymerase</i>
NCBI	do inglês <i>National Center For Biotechnology Information</i>
NCI	do inglês <i>National Cancer Institute</i>
PCR	do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
RNA	do inglês <i>acid ribonucleic</i>
SAGE	do inglês <i>Serial Analysis Gene Expression</i>
SAM	do inglês <i>S-adenosylmethionine</i>
TNM	Sistema de estadiamento, T= tumor, N= linfonodo (node, do inglês), M= metástase
VEGF	do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
VHL	do inglês <i>von Hippel Lindau</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Corte Histológico mostrando os tipos de carcinoma renal....	27
Figura 2	Representação esquemática de um néfron e corte histológico do carcinoma renal de células claras.....	28
Figura 3	Esquema de metilação do DNA.....	41
Figura 4	Esquema ilustrando a atuação das DNA metiltransferases no processo de metilação.....	42
Figura 5	Repressão da transcrição.....	43
Figura 6	Estrutura cromatínica da região promotora ativa e inativa...	46
Figura 7	Esquema ilustrando alteração no padrão de metilação na formação da tumorigênese.....	51
Figura 8	Porcentagem de amostras por estágio tumoral.....	57
Figura 9	Avaliação da qualidade dos RNAs em gel de agarose 1%...	81
Figura 10	Resultado da amplificação do gene β -ACTINA para validação dos cDNAs.....	82
Figura 11	Análise digital do gene <i>KTN1</i> por SAGE <i>in Silico</i>	84
Figura 12	Expressão diferencial do gene <i>GPC3</i> por Northern digital....	85
Figura 13	Valor da expressão gênica do <i>ADAM23</i> pela técnica de Microarray digital.....	86
Figura 14	Média do valor da expressão gênica em log2 dos genes selecionados.....	89
Figura 15	Valor da expressão gênica em log2 do gene <i>GPC3</i>	90
Figura 16	Média do valor da expressão gênica em log2 do gene <i>GPC3</i>	90
Figura 17	Valor da expressão gênica em log2 do gene <i>CRABP2</i>	91
Figura 18	Média do valor da expressão gênica em log2 do gene <i>CRABP2</i>	91

Figura 19	Valor da expressão gênica em log2 do gene <i>KTN1</i>	92
Figura 20	Média do valor da expressão gênica em log2 do gene <i>KTN1</i>	92
Figura 21	Valor da expressão gênica em log2 do gene <i>ADAM23</i>	93
Figura 22	Média do valor da expressão gênica em log2 do gene <i>ADAM23</i>	93
Figura 23	Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação do DNA pelo gene <i>β-GLOBINA</i>	96
Figura 24	Gel de poliacrilamida 8% evidenciando o padrão de metilação do gene <i>ADAM23</i>	97

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	24
Tumor Renal.....	25
Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) <i>in Silico</i>	37
Metilação do DNA.....	39
Metilação e Câncer.....	48
OBJETIVOS.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
Casuística.....	55
Metodologia para Análise da Expressão Gênica.....	58
I. Extração de RNA Total.....	58
II. Obtenção do cDNA por transcriptase reversa.....	59
III. Controle da qualidade do cDNA.....	60
IV. Seleção dos genes por SAGE <i>in Silico</i>	61
V. PCR em Tempo Real – PCR Quantitativa.....	62
Metodologia para Análise do Padrão de Metilação.....	68
I. Extração de DNA pela técnica do TRIzol.....	68
II. Controle da qualidade do DNA.....	69
III. Extração de DNA de Linfócitos.....	70
IV. Metilação <i>in Vitro</i>	71
V. Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio.....	72
VI. MSP-PCR.....	73
Análise Estatística.....	76
RESULTADOS.....	77
Dados clínicos.....	78
Análise da Expressão Gênica.....	79
I. Seleção das amostras.....	79
II. Seleção do genes por SAGE <i>in Silico</i>	83

III. Validação da Expressão Gênica.....	87
Análise do Padrão de Metilação por MSP-PCR.....	94
DISCUSSÃO.....	98
CONCLUSÃO.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	128
Anexo A - Termo de Consentimento.....	129
Anexo B – Tabela 8	130

Introdução

I. Tumor Renal

O tumor renal é a mais letal das patologias doenças, sendo responsável por aproximadamente 3% das mortes por câncer no mundo (PETRELLA, BRINCKERHOFF, 2006; GARG et al., 2008). A incidência deste tumor vem aumentando durante os últimos 50 anos, cerca de 100.000 pessoas morrem da doença a cada ano (GARG et al., 2008; PATARD et al., 2008). De acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos foram previstos para o ano de 2008, 54.390 novos casos e 13.010 mortes pela doença (JEMAL et al., 2008).

Devido ao avanço significativo na detecção precoce dos tumores renais, proporcionada principalmente pela melhora nos procedimentos de imagem como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, o número de indivíduos diagnosticados com tumor renal cresceu muito na últimas décadas (DRUCKER, 2005; LANG et al., 2007).

O Carcinoma renal acomete mais homens que mulheres e ocorre com maior frequência em indivíduos com idade avançada, 50-70 anos (MARTIGNONI et al., 2006). É uma doença heterogênea, baseada em diferenças na morfologia, alterações genéticas e comportamento clínico, que está subdividida em cinco tipos: células claras, papilífero ou cromofílico, cromofóbico, ducto medular e oncocitomas (WOODWARD et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; FURGE et al., 2007; PULIDO et al., 2007). A classificação histológica é baseada na localização do néfron,

características citoplasmáticas e no tipo de célula que originou o tumor (DRUCKEN, 2005).

Os oncocitomas são tumores benignos e correspondem a 4% dos tumores renais. O carcinoma de ducto medular é o tipo mais raro (1%) que afeta indivíduos jovens, é pouco agressivo, apresenta uma alta recorrência após a cirurgia e resposta limitada à terapia. O carcinoma cromofóbico tem sido relatado em 5% dos casos de câncer renal, apresenta células grandes com citoplasma reticulado e bom prognóstico. O carcinoma papilífero representa cerca de 10% dos carcinomas renais, é morfológicamente caracterizado pela presença de papilas contendo núcleo com agregados de macrófagos, grânulos de hemosiderina e cálcio, e está subdividido em tipo 1 e tipo 2, denominados, respectivamente, de basofílico e eosinofílico (Figura 1) (LABER, 2006; NELSON et al, 2006).

O carcinoma renal de células claras (CRcc) é o subtipo histológico mais comum dentre os tumores renais, compreendendo 80-85% de todos os casos, e o que apresenta o pior prognóstico. Este carcinoma, originado das células dos túbulos proximal dos néfrons, é caracterizado histologicamente pela presença de um citoplasma claro e abundante, com freqüente invasão vascular e metástases (Figura 2) (WOODWARD et al, 2000; BODMER, 2002; LABER, 2006; MAI et al, 2006; NELSON et al, 2006; REUTER et al, 2007).

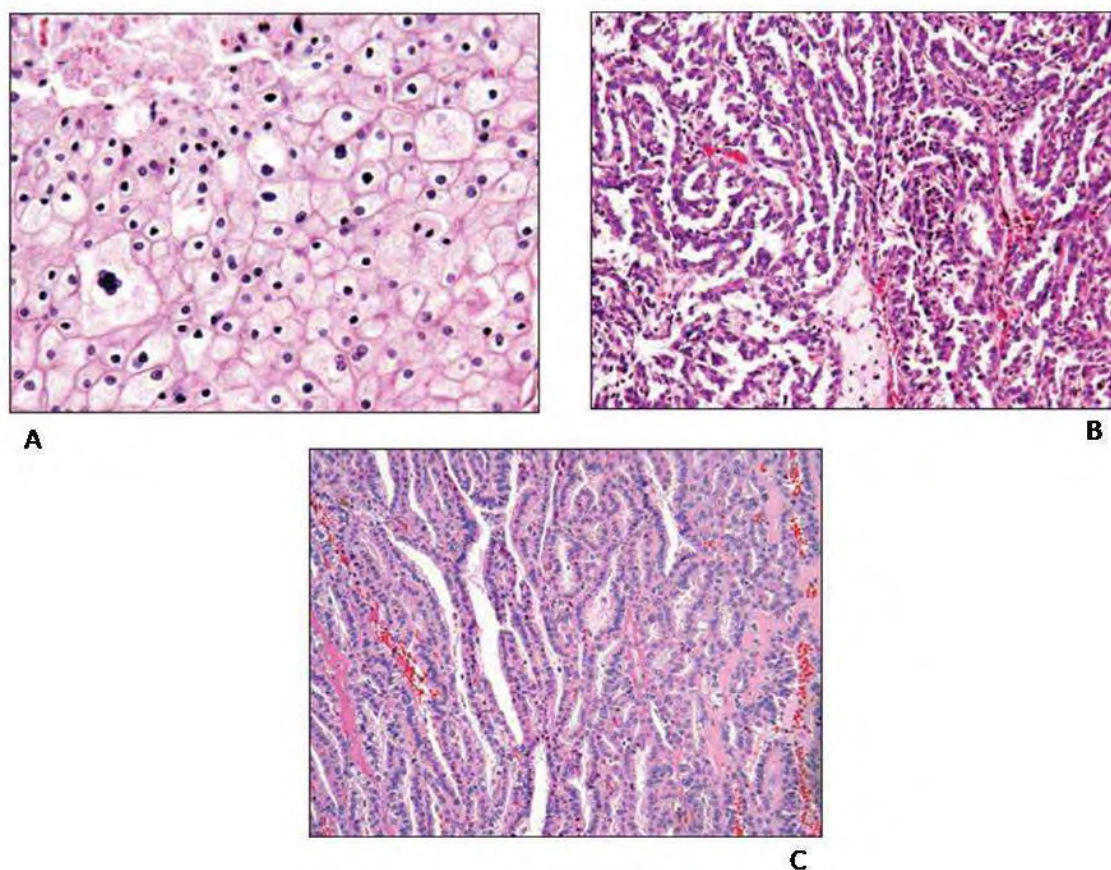


Figura 1: Cortes histológicos mostrando os tipos de carcinoma renal. (A) Cromofóbico: caracterizado por células grandes com membranas proeminentes e citoplasma reticulado. (B) Papilífero tipo I: pequenas células cubóides alinhadas com citoplasma basofílico e núcleos pequenos. (C) Papilífero tipo II: células pseudoestratificadas com presença de citoplasma eosinofílico. (Modificado de Ng et al, 2008)

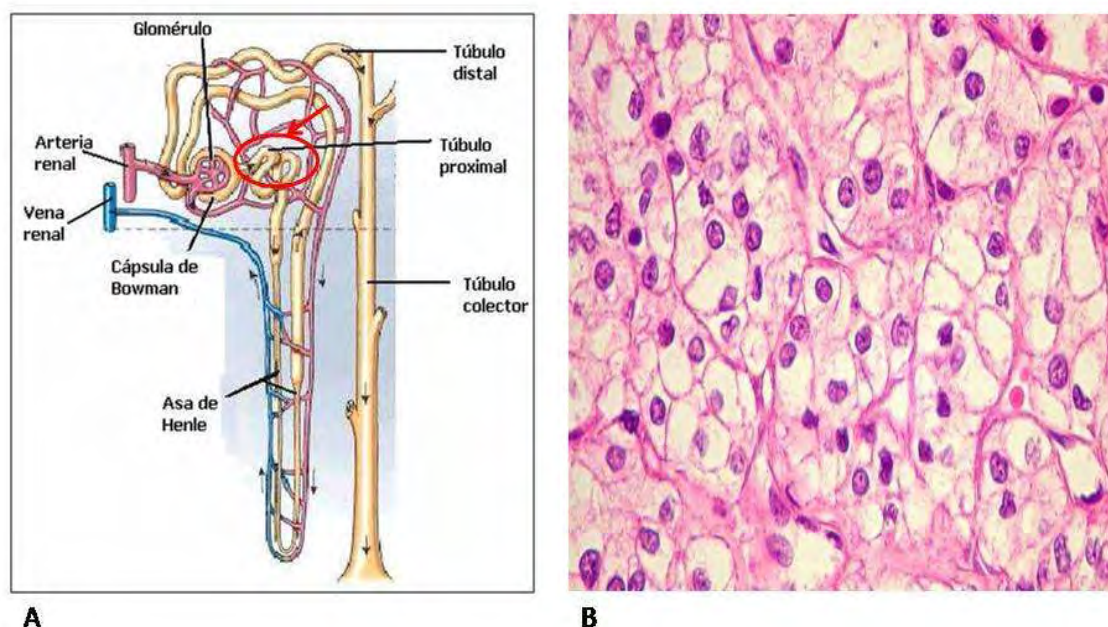


Figura 2: Representação esquemática de um néfron (A) e corte histológico do carcinoma renal de células claras (B). (A) Indica a origem (seta) do carcinoma renal de células claras a partir das células dos túbulos proximais dos néfrons (<http://mazapan-hadita.freeblog.hu/>). (B) Corte histológico evidenciando a presença de um citoplasma claro e abundante, com freqüente invasão vascular, característicos do carcinoma renal de células claras (<http://anatpat.unicamp.br/lamuro17.html>).

O tumor pode se estender diretamente dentro da gordura perinéfrica, glândula adrenal ou musculatura adjacente, e menos freqüente no fígado, baço, pâncreas e cólon (NG et al., 2008).

A causa dos carcinomas de células renais é desconhecida, porém vários fatores de risco têm sido associados com a alta incidência desta doença (LABER, 2006), dentre eles: tabaco, obesidade, hipertensão, álcool, fatores hormonais e predisposição genética (BEISLAND et al., 2006; LABER, 2006; LIPWORTH et al., 2006; ZBAR et al., 2007).

O carcinoma renal é freqüentemente diagnosticado durante tomografia computadorizada e ultrassonografias, e 25% dos pacientes são diagnosticados com a doença em estágio avançado (KARAKIEWICZ et al., 2007; WOOD et al., 2007). Embora a maioria dos indivíduos seja completamente assintomática, alguns podem apresentar uma variedade de sintomas, como dor abdominal, massa abdominal palpável e hematúria. Outros sintomas não específicos também podem ser observados, como fadiga, perda de peso e anemia (HASS et al., 2007).

Incidentalmente, os tumores detectados em indivíduos assintomáticos vêm aumentando de forma progressiva com a disseminação de técnicas de imagens, como a tomografia computadorizada e ressonância magnética, representando aproximadamente 60% dos tumores renais na década de 90, comparado com os 10% no inícios dos anos 70 (NG et al., 2008).

O prognóstico é baseado principalmente no sistema de estadiamento TNM, ou seja, tamanho e extensão tumoral, envolvimento de linfonodo loco-regional e a presença de metástases (BYUN et al., 2007; TAWFIK et al., 2007; THOMPSON et al., 2007; FICARRA et al., 2008). Embora a quimioterapia e a radioterapia possam ser utilizadas, o tratamento do carcinoma renal ocorre principalmente por meio da nefrectomia parcial ou total e a imunoterapia com interferon- α e interleucina-2, as quais são modalidades terapêuticas bem estabelecidas. No entanto, 30% dos pacientes tratados desenvolvem metástases (DRUCKER, 2005; PETRELLA, BRINCKEHOFF, 2006), apresentando uma expectativa de vida de 12 meses (TAKAHASHI et al., 2001).

Além disso, cerca de 30% dos pacientes que sofreram nefrectomia podem desenvolver recorrência tumoral sistêmica ou local. A incidência de recorrência aumenta com o avanço do estadiamento tumoral (KLATTE et al., 2008).

A ocorrência de CRcc geralmente é esporádica, embora síndromes genéticas possam causar um padrão de herança familiar. A mais freqüente alteração neste tumor é a perda parcial ou completa do cromossomo 3p. A deleção na região 3p25-p14.2 ocorre em 96% dos casos e parece ser um evento crucial no desenvolvimento do tumor associado com o início da tumorigenese (NELSON et al., 2006; CASCÓN et al., 2007).

O gene Von Hippel-Lindau (*VHL*), localizado na região 3p25-26, é um gene supressor tumoral relacionado com CRcc (CASCÓN et al., 2007), que quando alterado, resulta na desregulação da hipoxia incluindo uma super produção do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), que por sua vez promove angiogênese, crescimento tumoral e desenvolvimento metastático (CHOUEIRI et al., 2006). A inativação do *VHL* ocorre devido à mutação, deleção alélica ou silenciamento epigenético por metilação da região promotora, que estão presentes em 60% dos casos esporádicos de carcinoma renal de células claras (REUTER et al., 2007; SAWHNEY, KABBINAVAR, 2008).

Na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese renal, alguns autores têm identificado, pelas técnicas de *microarray* e SAGE, genes que apresentam alta expressão e genes com baixa expressão, em carcinoma renal de células claras, quando comparada com córtex renal normal (TAKAHASHI et al., 2001; HIROTA et al., 2006).

Nesse trabalho foi analisado genes que estão envolvidos na carcinogênese renal e em outros tipos tumores. Dentre os genes que podem atuar como candidato a marcadores moleculares na carcinogênese renal, destaca-se o gene Glipican 3 (*GPC3*), encontrado hipoexpresso em amostras tumorais, como em câncer de mama, de ovário e de rim (TAKAHASHI et al., 2001; STIGLIANO et al., 2008). Outros genes, como proteína ligante de ácido retinóico celular 2

(*CRABP2*), metaloendopeptidase domínio 23 (*ADAM23*) e kinectina (*KTN1*) também podem atuar como importantes biomarcadores, uma vez que já foram encontrados com baixa expressão em outros tipos de tumores, dentre eles, o tumor ósseo de células gigantes e tumor de cabeça e pescoço (CALMON et al., 2007). A Tabela 1 apresenta as características desses genes.

O gene Glipican 3 (*GPC3*), localizado na região cromossômica Xq26.1, é um membro de uma família glipicana de proteoglicano de heparina sulfatada (HSPG) que se liga à membrana celular pela via do glicosilfosfatidilinositol (KWACK et al., 2006; JIA et al., 2007).

As HSPGs são bem conhecidas por interagir com fatores de crescimento através de cadeias de heparina sulfatada (HS). Algumas evidências sugerem que gene dessa família possa estar envolvido no controle de proliferação e migração celular, regulação negativa do crescimento celular e indução de apoptose. Esse gene está associado com a progressão do carcinoma hepatocelular e pode ter um papel significativo na hepatocarcinogênese (MIDORIKAWA et al., 2003; STIGLIANO et al., 2008).

A expressão do *GPC3* é freqüentemente silenciada pelo mecanismo de hipermetilação de sua região promotora em linhagens celulares de tumor ovariano, linhagem celular de câncer de mama e em vários tumores malignos, como carcinoma ovariano, mesotelioma, colangiocarcinoma (SUNG et al., 2003; BAUMHOER et al., 2008).

O gene que codifica a proteína ligante de ácido retinóico celular 2 (*CRABP2*) está localizado na região cromossômica 1q21.3. As proteínas ligantes de ácido retinóico (*crabp*) são proteínas de baixo peso molecular cuja função exata ainda permanece desconhecida, entretanto, acredita-se que essas proteínas sejam responsáveis pelo transporte intracelular e metabolismo de retinóides. A indução desse gene sugere que esta isoforma é importante na regulação, mediada por ácido retinóico, no crescimento e na diferenciação celular da pele humana. Este gene está intimamente relacionado com a síntese do ácido retinóico (MILLER, 1998; UCHIDA et al., 2001; EVERTS et al., 2007).

O ácido retinóico, um metabólito ativo da vitamina A, regula múltiplos processos biológicos, incluindo proliferação e diferenciação celular e apoptose, além de ter uma importante função no desenvolvimento embrionário e no crescimento e remodelamento de tecidos. Ácidos retinóicos naturais ou sintéticos, conhecidos como retinóides, são potentes inibidores do crescimento de células cancerosas e parecem ser eficientes na terapia e prevenção de vários tipos de cânceres (DONATO, NOY, 2005).

Tem sido postulado que o gene *CRABP2* é transcricionalmente regulado por uma proteína regulatória recém-sintetizada, e constitui o principal regulador da atividade anti-carcinogênica do ácido retinóico (OKUDUCU et al., 2005).

O gene *ADAM23*, localizado na região cromossômica 2q33, é membro da família de proteínas adam. A família de proteínas adam (domínios Desintegrina e Metaloprotease) compreendem proteínas de superfície celular que estão ancoradas à membrana, e atuam em interações célula-célula, interações célula-matriz e em atividades de protease. Os membros dessa família apresentam organização estrutural formada por um domínio de metaloprotease, um domínio desintegrina, fator de crescimento epidérmico, um domínio rico em cisteína, domínios transmembrana e citoplasmático (SUN et al., 2003; COSTA et al., 2005; CALMON et al., 2007).

Essas proteínas têm sido implicadas em uma variedade de processos biológicos, dentre eles, o desenvolvimento muscular e a neurogênese (GOLDSMITH et al., 2004). Além dessas funções, os membros da família adam possuem um importante papel no desenvolvimento e progressão da tumorigênese, devido à sua habilidade de adesão celular e atividade proteases (COSTA et al., 2004).

Alguns autores relatam que a baixa expressão do *ADAM23* está associada com o poder de invasão e progressão tumoral e metastização em tumores cerebrais e de mama. Estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar o papel do gene *ADAM23* na progressão tumoral e explorá-lo com um potencial marcador tumoral (COSTA et al., 2004).

O gene *KTN1*, localizado na região cromossômica 14q22.1, codifica a proteína kinectina, que atua como receptor intracelular de

membrana para kinesina, encontrada no retículo endoplasmático, é responsável pela movimentação de organelas intracelulares entre microtúbulos (BAI et al, 2006). Esta proteína possui uma porção terminal NH_2 que consiste em um domínio transmembrana que a ancora à membrana de organelas, a porção terminal COOH , um domínio ligante de kinesina, interage ligando-se à kinesina e reforça a atividade de ATPase da mesma. A kinesina se liga aos microtúbulos pela sua porção N-terminal, e a porção C-terminal liga-se às superfícies de organelas (ONG, et al., 2003).

A kinectina também interage com outras proteínas, como a proteína Rho, que forma o complexo Rho-kinectina, responsável pelo transporte de microtúbulos entre os filamentos de actina (HOTTA et al, 1996), e o fator de alongação da tradução-1 δ . A interação da kinectina com o fator de alongação da tradução-1 δ é importante na regulação da síntese protéica de células eucarióticas (ONG et al., 2006).

Tabela 1: Caracterização dos possíveis genes candidatos a marcadores moleculares na carcinogênese renal.

Símbolo	Gene ID	Função Gênica	Processos Envolvidos	Localização
do Gene				Protéica
GPC3	2719	Controle da divisão celular e Regulação do Crescimento Celular	Morfogênese da Estrutura Anatômica	Membrana e Região extracelular
CRABP2	1382	Atividade de transporte e Ligação à Retinol	Regulação da Transcrição, Transdução de Sinal e Transporte	Núcleo e citoplasma
ADAM23	8743	Ligação às integrinas e proteínas, Atividade de metaloenzima	Adesão Celular, Proteólise, Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central	Membrana e Região extracelular
KTN1	3895	Função molecular e Receptor de atividade	Movimento baseado em microtúbulos	Retículo Endoplasmático

II. Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE) *in Silico*

Atualmente, várias técnicas permitem a análise da expressão gênica em larga escala, dentre elas destaca-se a análise serial da expressão gênica (SAGE ou *Serial Analysis of Gene Expression*).

A técnica de SAGE é uma das mais potentes metodologias para avaliar o nível de expressão gênica do RNA mensageiro (RNAm), permite a análise quantitativa e simultânea de milhares de transcritos, sejam eles conhecidos ou desconhecidos, de um determinado tipo celular ou tecido (SANTOS, 2006; WANG et al, 2008).

Essa técnica, proposta por VELCULESCU e colaboradores (1995), é baseada em três princípios: (1) uma pequena seqüência de nucleotídeos (9-14 pb), denominada de *tag*, de uma região específica do RNAm contém informação suficiente para identificar um único transcrito; (2) as tags podem ser ligadas formando concatêmeros, ou seja, longas seqüências de DNA, que são clonadas e seqüenciadas; (3) as tags são identificadas com o auxílio de um software (SAGE 2000) (WANG et al, 2008). O nível de expressão de um transcrito é quantificado pelo número de vezes que a *tag* que o representa é observada (SANTOS, 2006).

O CGAP (*Cancer Genome Anatomy Project*) é um programa administrado pelo NCI (*National Cancer Institute*, EUA), que tem como objetivo determinar o perfil de expressão gênica em células cancerígenas

e pré-malignas, levando à melhoria na detecção, diagnóstico e tratamento da doença (STRAUSBERG et al, 2001).

Sendo assim, foi construído um catálogo online de genes expressos em tecidos tumorais e normais, no qual foram incluídos seqüências *tags* expressas (ESTs) e SAGE. Para facilitar a utilização dos dados de expressão gênica, todos os dados ESTs foram depositados no GenBank, base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Um novo banco de dados público, denominado SAGEmap foi desenvolvido pela colaboração NCBI-CGAP, que tem como objetivo coletar dados a partir das análises de SAGE (STRAUSBERG et al., 2001).

A metodologia de SAGE apresenta melhor custo-benefício para gerar dados sobre expressão gênica, quando comparado aos dados de análises de ESTs. Na base de dados seguinte, www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE, as tags de SAGE são relacionadas a grupos de *Unigene* (*Clusters Unigene*), aquelas diferencialmente expressas podem ser identificadas e os níveis de expressão determinados (BOON et al., 2002).

O SAGE Genie, outra divisão do CGAP, permite processar os dados gerados por SAGE, pelo SAGE Anatomic Viewer, onde é possível visualizar os níveis de expressão de transcritos para qualquer gene, comparando tecidos normais e neoplásicos (BOON et al., 2002).

A utilização da técnica de SAGE tem se mostrado importante em vários estudos, tais como a descoberta de potenciais reguladores transcricionais, identificação de novos marcadores moleculares tumorais e alvos terapêuticos (WANG et al., 20008).

III. Metilação do DNA

Os eventos epigenéticos têm uma significativa e freqüente atuação no desenvolvimento e na progressão tumoral (BAYLIN, 2005). Esses eventos são definidos como mudanças hereditárias na expressão gênica que não são acompanhadas por modificações na seqüência do DNA (NEPHEW, HUANG, 2003; JONES, BAYLIN, 2007; VUCIC et al., 2008). As alterações covalentes no DNA ou empacotamento de histonas são responsáveis pela transmissão da informação epigenética (FAZZARI, GREALLY, 2004).

A metilação do DNA é um processo reversível (PLASS, 2002) que está associado com vários aspectos da regulação epigenética, incluindo silenciamento da expressão gênica, organização da estrutura da cromatina e diferenciação celular (KATOH et al., 2006).

O processo de metilação do DNA é uma modificação bioquímica que ocorre em citosinas que se situam em um dinucleotídeo simétrico CpG (citosina – fosfato – guanina) (ISSA, 2004). Este processo decorre da transferência enzimática de um grupo metil do doador S-

denosilmetionina (SAM) para o carbono 5' na citosina (HUANG, 2008; VUCIC et al., 2008). As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) são responsáveis pela adição deste radical, metil, na posição 5 da citosina, originando a 5 – metilcitosina que está presente no dinucleotídeo CpG (BASTIAN et al., 2004; HÁ, CALIFANO, 2006) (Figura 3).

A primeira metiltransferase a ser descoberta, conhecida como DNMT1, é importante para a manutenção da metilação do DNA, ou seja, mantém a ligação dos grupos metil ao DNA hemimetilado durante o processo de replicação. Enquanto as DNMT3A e DNMT3B atuam na formação de novos sítios de metilação, adicionando grupos metil em dinucleotídeos CpGs na sequência de DNA não metilada, em um processo chamado de metilação *de novo* (Figura 4) (PLASS, 2002; SANTOS et al, 2005; LUCZAK, JAGODZINSKI, 2006).

Os grupos metil podem influenciar as alterações entre a molécula de DNA e proteínas, diminuindo a afinidade de ligação entre as regiões promotoras e os fatores de transcrição por meio de mecanismos que envolvam mudanças na estrutura da cromatina ou nos níveis de acetilação de histonas (BESTOR, 1998) (Figura 5). Estes grupos são adquiridos pela dieta e doados pela via do folato e da metionina. As alterações que ocorrem na metilação do DNA podem resultar na diminuição dos níveis de folato e metionina, e ainda ocasionar profundas consequências, como defeitos no tubo neural, arteriosclerose, progressão

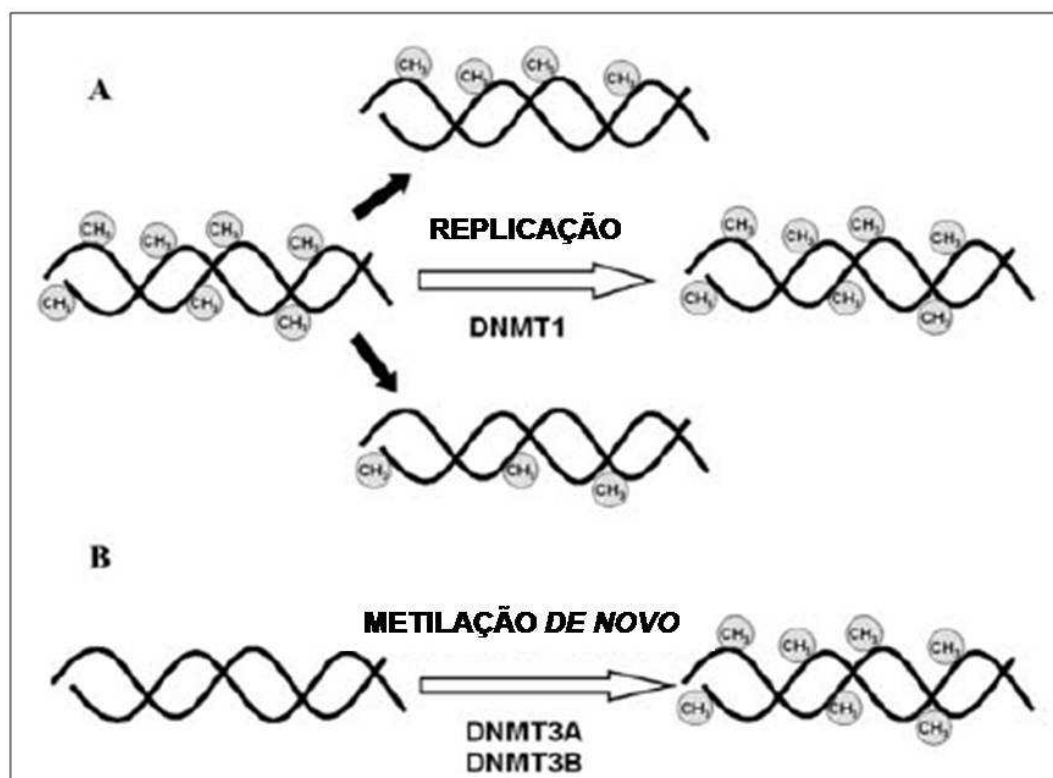


Figura 4: Esquema ilustrando a atuação das DNA metiltransferases no processo de metilação do DNA. (A) DNMT1 adiciona os grupos metil ao DNA hemimetilado, durante a replicação do DNA. (B) DNMT3A e DNMT3B adicionam grupos metil aos dinucleotídeos CpG do DNA não-metilado. (Modificado de LUCZAK, JAGODZINSKI, 2006).

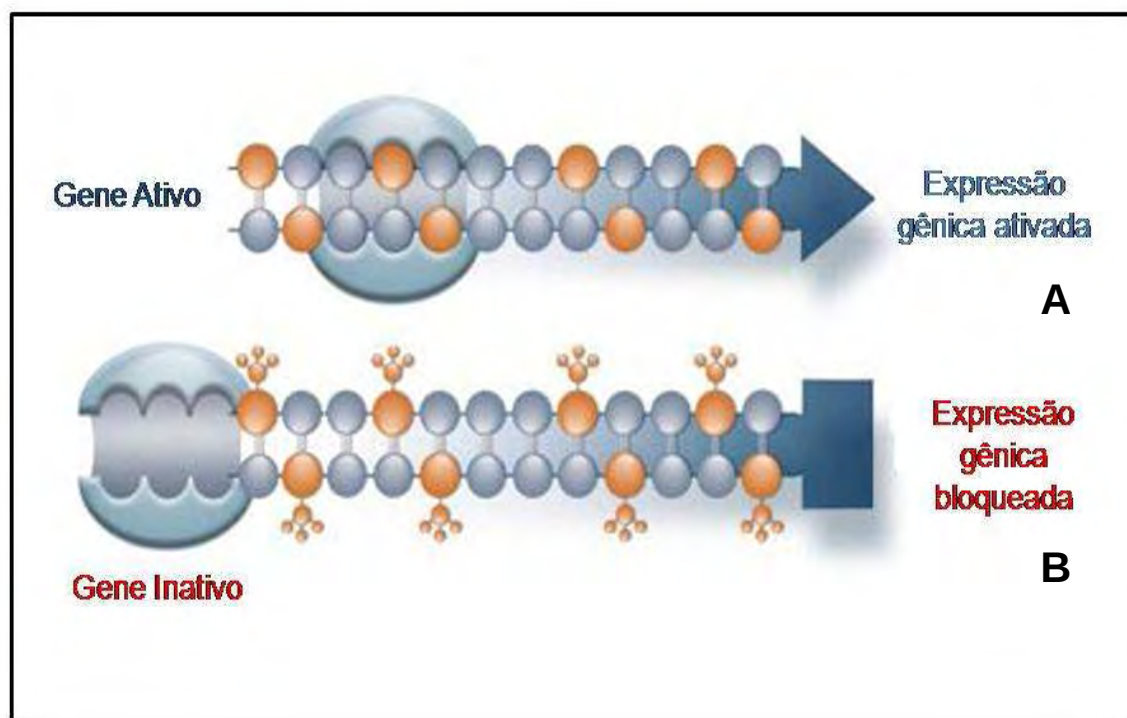


Figura 5: Região promotora de um gene ativo e de um gene inativo, de acordo com o estado de metilação de citosinas, encontradas em ilhas CpGs. (A) Representação de um gene ativo, no qual as citosinas não estão metiladas, o que permite a ligação dos fatores de transcrição à região promotora, ativando a expressão gênica. (B) Representação de um gene inativo, no qual as citosinas metiladas (representada por trevos) impedem a ligação dos fatores de transcrição à região promotora, bloqueando a expressão gênica. (Modificado de: http://www.med.uni-magdeburg.de/fme/zkh/prog/Unsere_Forschung/unsere_forschung.html)

tumoral, levando à instabilidade genômica (RODENHINSER, MANN, 2006).

A metilação do DNA pode participar de muitos processos celulares incluindo a regulação transcricional, a modificação cromatínica, a inativação do cromossomo X, o *imprinting* genômico, o envelhecimento e a carcinogênese (CLARK, WARNECKE, 2002; BAYLIN, 2005).

Embora a metilação controle a atividade gênica, ela sozinha não é suficiente para reprimir a transcrição. A estrutura da cromatina também contribui na determinação da transcrição gênica. As DNMTs podem regular o silenciamento gênico por meio da metilação do DNA recrutando deacetilases de histonas (HDACs) e outras proteínas de ligação à cromatina promovendo a deacetilação de histonas (BAYLIN, 2005).

As histonas são proteínas de empacotamento do DNA que participam da regulação da expressão gênica e armazenam informações epigenéticas por modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação e fosforilação (ESTELLER, 2008).

A acetilação de histonas é uma modificação reversível, controlada por acetilases de histonas (HATs) e deacetilases de histonas (HDACs), que atuam, respectivamente, como co-ativadores e co-repressores transcricionais. Esse processo de acetilação afeta tanto a estrutura cromatínica como a interação das proteínas regulatórias da transcrição como o DNA alvo, modulando a expressão gênica. A remoção dos grupos acetil pelas HDACs resulta na compactação da cromatina e repressão da

transcrição gênica. Os baixos níveis de acetilação podem induzir o processo de metilação do DNA, levando ao silenciamento gênico (GRONBAEK et al., 2007; ESTELLER, 2008; VAISSIÈRE et al., 2008).

As citosinas metiladas de promotores silenciados ligam-se a um grupo específico de proteínas, as MBD (*Methyl-CpG-binding domain protein*), em um complexo que inclui as HDACs, inibindo a expressão gênica por bloquear a ligação dos fatores de transcrição à região promotora. (Figura 6) (GRONBAEK et al., 2007; VAISSIÈRE et al., 2008).

A metilação não está distribuída aleatoriamente no genoma, regiões discretas, como elementos repetitivos de DNA estão hipermetiladas. Existem no genoma seqüências curtas de DNA ricas em dinucleotídeos CpGs, conhecidas como ilhas CpG, com aproximadamente 0,5-4,0 Kb de extensão (JONES, BAYLIN, 2002), que contêm 500 pb e estão freqüentemente associadas à região promotora de genes, onde é iniciada a transcrição (BAYLIN, HERMAN, 2000; COTRELL, 2004). O genoma humano contém, aproximadamente 29.000 ilhas CpGs, com preferência pelas regiões promotoras do primeiro éxon de genes codificadores de proteínas (FRUHAWLD, PLASS, 2002).

A seqüência de dinucleotídeos CpG carrega a base modificada, 5-metil-citosina (5-mC), que pode ser mantida no genoma pela atividade das enzimas DNA metiltransferases, durante a replicação do DNA (BASTIAN et al., 2004). Entretanto, agentes desmetilantes como a 5-aza-2-deoxicitidina e decitabina são poderosos inibidores da metilação do DNA.

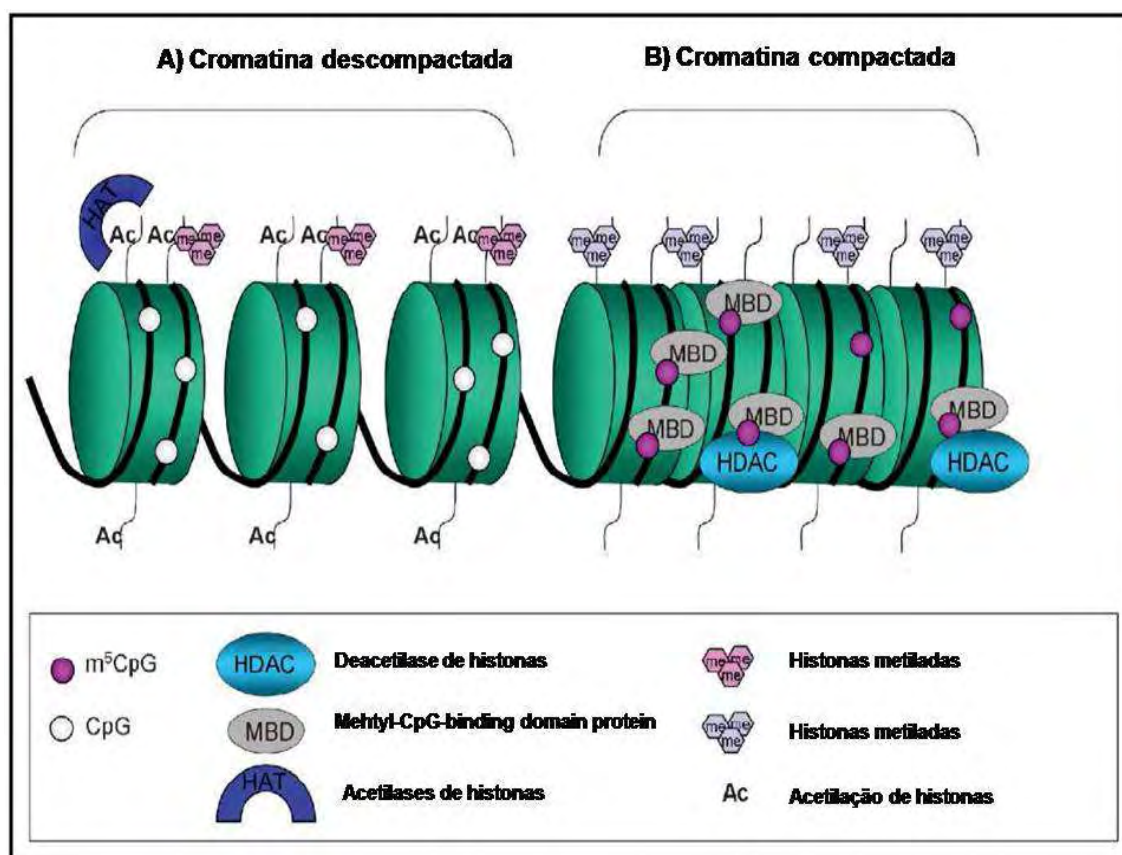


Figura 6: Estrutura cromatínica da região promotora ativa e inativa. A) Cromatina transcricionalmente ativa é caracterizada por citosinas não metiladas e histonas acetiladas. B) Citosinas metiladas ligadas à MBD recrutam HDACs, que removem os grupos acetil das histonas; assim ocorre a compactação da cromatina seguindo do silenciamento transcricional. (Modificado de GRONBAEK et al, 2007).

Devido à substituição do átomo nitrogênio na posição 5', as DNMTs são aprisionadas na fita de DNA substituída, inibindo o processo de metilação (BAYLIN, 2005; TING et al, 2006).

A maioria de ilhas CpGs livres de metilação estão associadas com genes transcricionalmente ativos, denominados de genes *housekeeping* (WORM, GULDBERG, 2002), no entanto, certas ilhas CpGs normalmente metiladas em células normais estão associadas ao *imprintig* genômico e à inativação do cromossomo X em fêmeas (ESTELLER, HERMAN, 2002).

A metilação de ilhas CpGs, freqüentemente encontrada em células tumorais, consiste em um importante mecanismo de silenciamento transcricional de genes, os quais podem ser identificados como marcadores epigenéticos específicos para certos tipos de tumores. Muitos desses marcadores, associados com o fenótipo da doença, têm sido utilizados como biomarcadores de predisposição, detecção precoce, prognóstico e resposta ao tratamento, representando alvos terapêuticos potenciais (VUCIC et al., 2008).

Dessa forma, a avaliação dos padrões alterados de metilação tem sido utilizada para disrupções cromossômicas e inativação de múltiplos genes supressores de tumor, podendo este serem utilizados como biomarcadores importantes na fisiopatologia de várias doenças, principalmente em tumores (FRIGOLA et al., 2002; BASTIAN et al., 2004).

Várias técnicas permitem rastrear o genoma à procura de padrões alterados de metilação, entre elas, a técnica de MSP-PCR (*Methylation-Specific Polymerase*), um método rápido e qualitativo para analisar a presença de metilação no DNA (MOMPARLER, BOVENZI, 2000).

IV. Metilação e Câncer

Carcinogênese é um processo gradual de acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas, que podem levar à disfunção celular. É amplamente conhecido que a desregulação epigenética, metilação do DNA, atua no desenvolvimento e progressão tumoral (JONES, 2003). Estudos recentes indicam que essas alterações epigenéticas podem ocorrer em qualquer momento durante a progressão do tumor (BAYLIN, OHM, 2006).

As mudanças no padrão de metilação do DNA ocorrem nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor e são detectadas em qualquer tipo de tecido neoplásico. (PALUSZCZAK, BAER-DUBOWSKA, 2006).

As células tumorais são caracterizadas por hipometilação global e hipermetilação de ilhas CpGs, que geralmente não são metiladas em células normais. O principal efeito carcinogênico da hipometilação do DNA é mediado pela capacidade de criar instabilidade gênômica. A

hipometilação pode ocasionar quebras cromossômicas, translocações e/ou perdas alélicas. (GRONBAEK et al, 2007)

Eventos de hipermetilação podem fornecer informação de prognóstico, uma vez que podem refletir no crescimento e no potencial maligno das células tumorais. A perda de função de genes envolvidos no controle do ciclo celular e da apoptose ou interações intercelulares é um fator associado com crescimento tumoral e potencial metastático. (PALUSZCZAK, BAER-DUBOWSKA, 2006). Assim, marcadores de hipermetilação podem ser usados para detecção de tumores primários e metastáticos ou em casos de recorrência. Para muitos genes a metilação aberrante emerge como alvo para o silenciamento em tumores (PALUSZCZAK, BAER-DUBOWSKA, 2006).

O silenciamento gênico por hipermetilação de genes supressores de tumor é o principal evento epigenético na carcinogênese, e o mais comum mecanismo de inativação desses genes em câncer. A metilação de ilhas CpGs localizadas próximo a sítios de início da transcrição de genes supressores tumorais (Figura 7) está associada com silenciamento gênico (GRONBAEK et al., 2007).

A hipermetilação de ilhas CpGs na região promotora pode afetar genes envolvidos no ciclo celular, reparo do DNA, metabolismo de carcinógenos, interação célula-célula, apoptose e angiogênese, todos envolvidos no desenvolvimento de um tumor (Esteller, 2008).

Os padrões de metilação do DNA e modificação de histonas, associados com o desenvolvimento e progressão tumoral, têm potencial uso clínico. Sendo assim, os marcadores de hipermetilação do DNA estão sob estudo, como ferramentas de diagnóstico, fatores prognósticos e preditores de resposta ao tratamento de um tumor (Esteller, 2008).

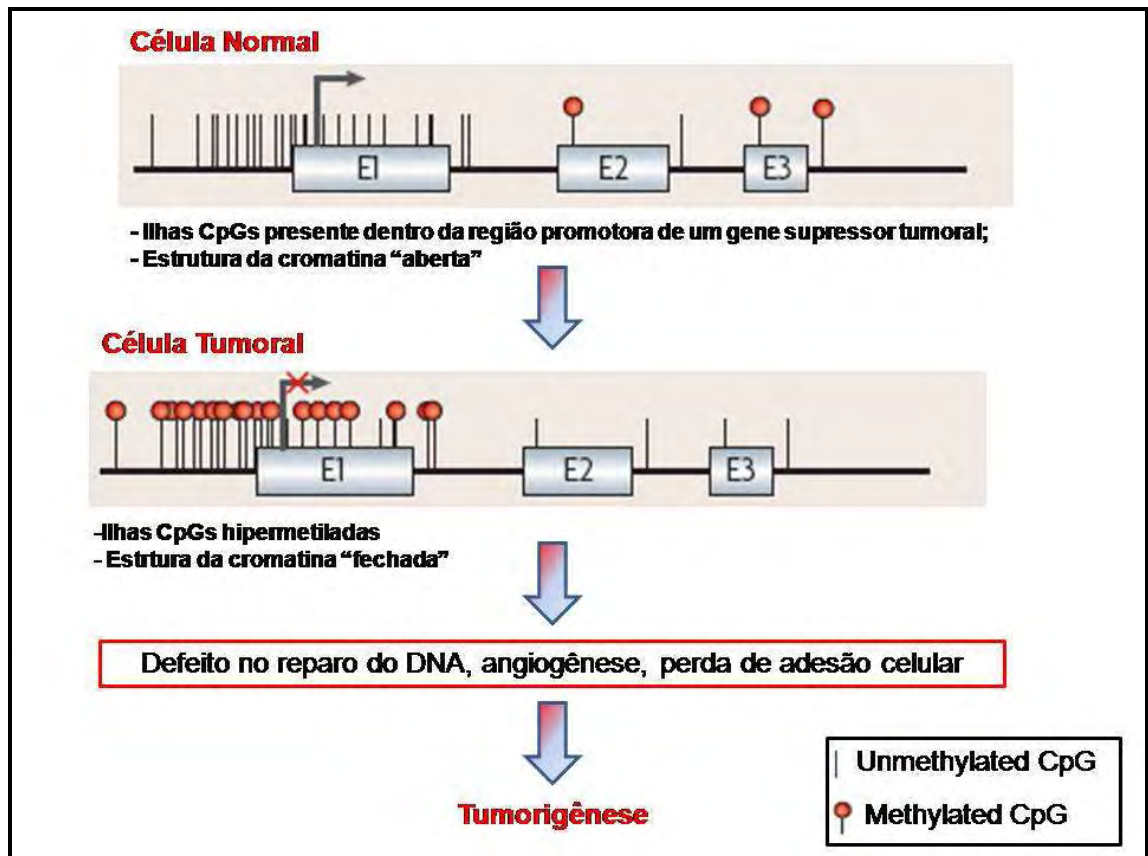


Figura 7: Esquema mostrando a alteração no padrão de metilação na formação da tumorigênese. A hipermetilação de ilhas CpGs presentes na região promotora de genes supressores tumorais é uma alteração comum em células cancerosas, ocasionando a inativação transcricional desses genes e a perda da função normal da célula (Modificado a partir de Esteller, 2007).

Objetivos

Em função do alto poder de metastização e da agressividade do tumor renal de células claras, têm sido identificados genes que possam ser empregados como biomarcadores na patogênese e progressão tumoral. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi analisar a expressão gênica dos genes selecionados e associar com o prognóstico.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

1. Selecionar genes que possuam ilhas CpGs e com expressão alterada em tecido tumoral, pela técnica de SAGE *in Silico*
2. Avaliar a expressão gênica dos genes selecionados por PCR em Tempo Real, em amostras de carcinoma renal de células claras e córtex renal normal;
3. Correlacionar os dados de expressão gênica com o avanço do estágio tumoral;
4. Analisar o padrão de metilação na região promotora dos genes que apresentaram associação entre expressão gênica e avanço do estágio tumoral, por meio da técnica de MSP-PCR;
5. Correlacionar a hipermetilação de ilhas CpGs com os dados clínicos.

Material e Métodos

Casuística

As amostras de tecido de carcinoma renal de células claras e tecido de córtex renal normal foram adquiridas junto ao Banco de Tumores do Hospital de Câncer de Barretos, independente de sexo, características étnicas ou idade. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Nº98/2007) e pelo Comitê do Banco de Tumores (Nº 018/2007) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas 35 amostras de carcinoma renal de células claras e 35 amostras de córtex renal normal, dos mesmos pacientes, todas colhidas após a ressecção cirúrgica e avaliadas pelo patologista para confirmação de ausência de qualquer tipo de alteração biológica. Os dados das amostras estão apresentados na Tabela 2.

Para correlacionar o estadiamento tumoral com a expressão gênica, as amostras foram divididas em quatro estágios tumorais. A Tabela 3 mostra as características de cada estágio, e a Figura 8 mostra a porcentagem de amostras em cada grupo.

As amostras colhidas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e encaminhados ao Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP/ IBILCE, para processamento e análise por meio das técnicas descritas abaixo.

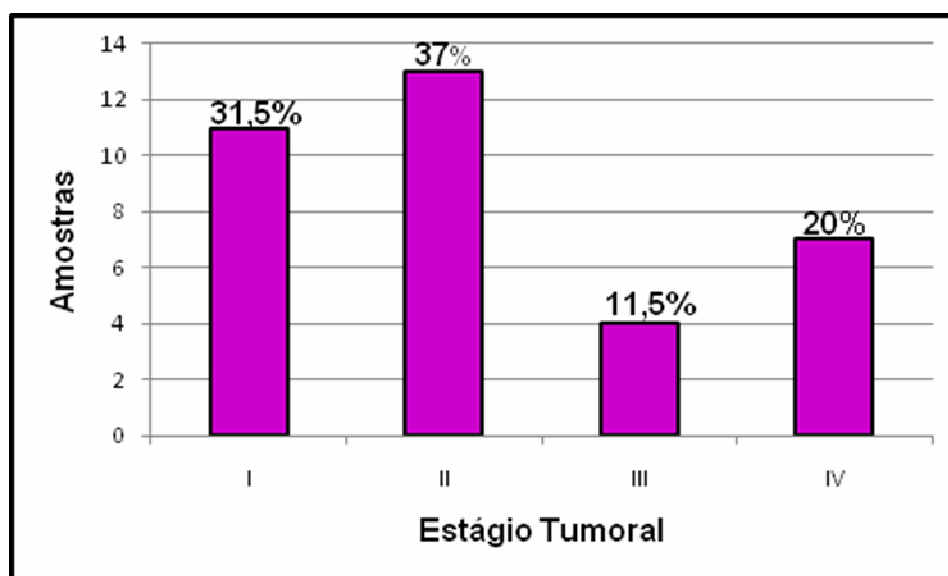
Tabela 2: Dados clínicos do pacientes com carcinoma renal de células claras: quanto ao sexo (M =masculino; F= feminino), idade (anos), etnia (B= branco, P= pardo, N= negro), etilismo, tabagismo, estadiamento TNM.

Amostras	Sexo	Idade	Etnia	Etilismo	Tabagismo	TNM
T1	M	58	B	Não	Não	T1N1M1
T2	F	39	P	Não	Não	T2N0M0
T3	F	71	B	Não	Não	T4N0M1
T4	F	64	B	Não	Não	T2N0M0
T5	M	46	B	Não	Não	T1bN0M0
T6	M	70	B	Não	Não	T2N0M0
T7	M	70	B	Sim	Sim	T3aN0M0
T8	F	58	P	Sim	Sim	T3N3M1
T9	M	36	B	Não	Não	T1aN0M0
T10	M	48	N	Sim	Não	T2N0M0
T11	M	52	B	Não	Não	T3aN0M0
T12	F	62	P	Não	Não	T1aN0M0
T13	M	75	B	Não	Sim	T1N0M0
T14	F	49	B	Não	Não	T1bN0M0
T15	F	71	B	Não	Não	T1N0M0
T16	F	79	B	Não	Não	T1aN0M0
T17	F	29	B	Não	Não	T2N0M0
T18	M	70	B	Não	Não	T2N0M0
T19	M	39	B	Não	Sim	T2N0M0
T20	M	66	B	Sim	Não	T2N0M0
T21	M	77	B	Não	Não	T2N0M1
T22	F	23	P	Não	Não	T2N0M0
T23	F	53	B	Não	Não	T2N0M0
T24	M	69	B	Não	Não	T3N0M0
T25	F	60	P	Não	Não	T3bN0M1
T26	F	79	B	Não	Não	T3aN0M0
T27	F	59	B	Não	Não	T2N0M0
T28	F	64	B	Não	Não	T1N0M0
T29	M	53	B	Sim	Não	T2N0M0
T30	M	56	B	Sim	Não	T1N1M1
T31	M	54	B	Não	Não	T2N0M0
T32	M	52	B	Sim	Não	T1aN0M0
T33	M	67	B	Sim	Não	T1aN0M0
T34	M	41	B	Não	Sim	T1N0M0
T35	F	55	B	Não	Não	T3aN2M1

Tabela 3: Caracterização de cada estágio tumoral.

Estágio	Característica
I	Tumor medindo de 2,5 a 7 cm, sem comprometimento de linfonodo e ausência de metástases.
II	Tumor acima de 7 cm, sem comprometimento de linfonodo e ausência de metástases
III	Tumor acima de 7 cm, com linfonodos comprometidos e ausência de metástases.
IV	Linfonodos comprometidos e presença de metástases

Referência: FRANCIS, 2006.

**Figura 8:** Porcentagem de amostras agrupadas em cada estágio tumoral.

Análise da Expressão Gênica

I. Extração de RNA Total

Para a extração do RNA, as amostras foram transferidas para tubos estéreis de 15mL contendo de 1 a 3mL de TRIzol (solução de extração de RNA, Life Technologies, Grand Island, NY), dependendo do tamanho da amostra. A etapa seguinte consistiu no processamento das amostras pelo Ultrahomoginizador (Marconi).

As amostras foram distribuídas em tubos estéreis de 1,5mL, sendo 1 mL para cada tubo, seguido da adição de 200µL de clorofórmio em cada, misturados durante 15 segundos e incubados à temperatura ambiente por 3 minutos. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 7.826g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o RNA permaneceu exclusivamente na fase superior aquosa. Essa fase foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5mL, no qual foi adicionado 500µL de isopropanol para a precipitação do RNA. A solução foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi centrifugada a 7.826g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1mL de etanol 75% ao sedimento, seguido de centrifugação por 5 minutos a 2.817g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, seco em temperatura ambiente. O RNA foi ressuspensionado em 30µL de água DEPC (dietil pirocarbonato). A próxima etapa foi a determinação da concentração dos RNAs ($1\text{DO}_{260}=40\mu\text{g/ml}$),

medindo-se a densidade óptica nos seguintes comprimentos de ondas: DO_{260}/DO_{280} , utilizando o aparelho Nanodrop (Uniscience).

Uma alíquota de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para análise das bandas específicas das subunidades 18S e 28S, representando o RNA ribossomal, ou sua degradação.

Depois de isolado o RNA total, as moléculas foram utilizadas para a síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

II. Obtenção do cDNA por transcriptase reversa

Para reação de RT foi utilizado o Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems). Foi utilizado 5 µg de RNA total, ao qual foi adicionado 1,25 µL de oligo dT (0,5µg/µL), 2,5 µL de dNTPs mix (25X), 5 µL de iniciadores randômicos (10X), 5,0µL de Tampão de Transcriptase Reversa (10X), 2,0µL de RNase OUT (40U/µL), 5,0µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50U/µL), e água para completar um volume final de 50µL.

A reação consistiu de uma etapa inicial à 25°C durante 10 minutos, e foi finalizada com uma incubação à 37°C por 120 minutos.

III. Controle da qualidade do cDNA

A etapa seguinte foi a validação do cDNA das amostras por meio da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de um fragmento de 613pb do gene β -*ACTINA*, o qual serve como controle para transcritos abundantes.

As reações foram processadas em 12,5 μ L utilizando 50ng de cDNA, 0,10 μ L da enzima Taq DNA polimerase (5U/ μ L), 2,10 μ L de dNTPs mix (1,25mM), 1,25 μ L Tampão (10X), 0,375 μ L de MgCl₂ (50mM) e 0,50 μ L dos iniciadores (10 μ M).

A reação compreendeu uma desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C, para o anelamento dos iniciadores, e 1 minuto a 72°C, para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C, para a extensão final.

Após a reação, os fragmentos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% junto com um marcador molecular de 100pb DNA Ladder (Fermentas), para verificar a amplificação de um fragmento de 613pb referente ao gene β -*ACTINA*. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

As seqüências de bases dos iniciadores utilizados para amplificação do fragmento de 613pb do gene β -*ACTINA* estão descritas a seguir:

5' GGCATCGTGATGGACTCC G 3'

3' GCTGGAAGGTGGACAGCG 5'

IV. Seleção dos genes por SAGE *in Silico*

A seleção dos genes para a validação da expressão gênica diferencial em carcinoma renal de células claras foi realizada pela virtualmente utilizando dados depositados no CGAP (The Cancer Genome Antomy Project : <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>) gerenciado pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) e pelo o programa H2G (*Hyper and Hypoexpressed Genes*) desenvolvido no Laboratório de Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia (Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto). O programa H2G permite selecionar genes com padrão diferente de expressão entre dois tecidos com base nos parâmetros de razão e diferença. Estes parâmetros são suficientes para a seleção de genes candidatos a ser validados por métodos laboratoriais.

Foram analisadas as bibliotecas: SAGE_Kidney_carcinoma_B_D2, originadas de carcinoma renal grau III,IV; e SAGE_Kidney_normal_B_1, de rim normal.

Para a seleção dos genes, foram considerados os 1000 genes mais expressos e os 1000 menos expressos de cada amostra, sendo excluídos os transcritos que estivessem representados com menos de três *tags* e aqueles que estivessem com razão (diferença de expressão entre as duas bibliotecas) menor do que cinco.

Após a seleção em bibliotecas de SAGE digital, os genes selecionados tiveram sua expressão diferencial avaliada em diversos

tecidos e linhagens celulares tumorais e normais através de comparações de dados públicos de *Northern Blot* e *Microarrays* virtuais também depositados no CGAP.

V.PCR em Tempo Real – PCR Quantitativa

Primeiramente, foram desenhados, com auxílio do programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystem), oligonucleotídeos iniciadores inter-éxons para cada gene selecionado, ou seja, para os genes alvos e para o gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), o qual foi utilizado como controle endógeno. Os iniciadores foram desenhados para que os produtos tivessem entre 80 a 150pb e apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60° C.

Posteriormente, foram realizadas reações de otimização, para escolher a melhor concentração de oligonucleotídeo iniciador para cada par, concentração essa que garanta a sua saturação para que os iniciadores não sejam fatores limitantes na velocidade da amplificação. As concentrações de iniciadores testadas foram 0,25µM; 0,4µM; 0,5µM; 0,75µM e 0,8µM.

As reações de padronização foram processadas em 20µL, contendo 25ng de cDNA, 10µL de Master Mix SYBR™ Green (Applied Biosystem) e os oligonucleotídeos iniciadores cujas concentrações variaram como descrito acima. O Master Mix SYBR™ Green contém

todos os componentes para a reação de PCR em tempo real, exceto o cDNA e os oligonucleotídeos iniciadores. Dessa forma, os componentes do Master Mix SYBRTM Green compreendem a enzima AmpliTaq Gold®, que catalizará a reação; a enzima UNG, a qual procura e degrada todo DNA dupla fita contendo uracila; o dye SYBER Green, fluoróforo que se intercala em DNA de fita dupla; os dNTPs e ROX, que é a referência passiva da reação.

Para uma melhor análise dos resultados, os ensaios de otimização de concentração de iniciadores foram realizados em triplicata para cada gene analisado. O cDNA utilizado nas reações foi um *pool* feito com as amostras que serão validadas, na concentração de 25 ng/ μ L, para minimizar as variações na padronização das reações de otimização dos iniciadores e validação da eficiência. Em todos os experimentos havia controles negativos.

As reações foram realizadas em equipamento para PCR em tempo real ABI Prism® 7300 (Applied Biosystem), e compreendeu uma etapa inicial de 2 minutos a 50°C para a ativação da enzima UNG. Em seguida, realizou-se um passo de 10 minutos a 95 °C para inativação da UNG, evitando, dessa forma, que a enzima degrade os produtos da amplificação que se iniciará em seguida, e também para a ativação da enzima AmpliTaq Gold®. Posteriormente, seguiram-se 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C para extensão. O anelamento dos iniciadores ocorreu durante a rampa de descida de 95°C a 60°C e a coleta

do sinal ocorre nos 30 segundos finais da etapa de extensão. Ao final, acrescentou-se um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15 segundos a 95°C, intercaladas por uma etapa de 30 segundos a 60°C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de dímeros de iniciadores, produtos inespecíficos e de contaminações.

A Tabela 4 mostra os pares de iniciadores desenhados para cada um dos genes selecionados, *GPC3*, *CRABP2*, *ADAM23* e *KTN1*, além dos resultados dos testes de otimização para verificar a melhor concentração de iniciador de cada gene.

Outro fator importante a ser considerado em experimentos de PCR quantitativo é verificar que a eficiência de amplificação do gene-alvo e o gene de referência, em função da concentração de RNA utilizado, é aproximadamente igual. Dessa forma, é possível extrair a expressão relativa do gene-alvo a partir dos resultados obtidos. Para esta verificação foram realizadas diluições seriadas de cDNA, sendo as concentrações finais utilizadas: 100 ng, 50 ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng. As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real. O teste foi realizado para cada gene, utilizando a concentração de iniciadores otimizada anteriormente.

O resultado da validação da eficiência é dado por um valor chamado de *slope*, que corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do C_t dos genes alvo e endógeno em função do Log

de diferentes quantidades de cDNA. O C_T (*Threshold Cycle*) é o momento no qual o sistema de amplificação começa detectar um aumento no sinal associado ao aumento exponencial do produto de PCR na fase linear da reação. As comparações de quantidade são feitas a partir dos valores dos C_T .

Os valores do *slope* foram padronizados -3,4, -3,2 e -3,6, refletindo uma eficiência de amplificação entre 96% a 107%. A eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para os genes alvo e endógeno foram calculadas de acordo com a equação: $E = 10^{(-1/slope)}$.

Após a etapa de padronização, foram realizadas as análises para verificar a expressão diferencial dos genes selecionados em amostras de carcinoma renal de células claras e amostras de córtex renal normal. As amostras foram testadas em triplicata e em todos os experimentos havia controle negativo, que é usado como controle de contaminação. As amostras controle, córtex renal normal, constituíram um *pool*.

O valor da expressão relativa dos genes alvo foi determinado pelo método de quantificação relativa em relação ao gene endógeno (normalizador). Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001). Esse modelo leva em consideração a eficiência de amplificação dos iniciadores no cálculo da expressão relativa, permitindo a quantificação relativa da expressão quando as eficiências de amplificação dos iniciadores são diferentes entre si.

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{T\text{alvo}}} / (E_{\text{endógeno}})^{\Delta C_{T\text{endógeno}}}$$

Em que E alvo corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o gene alvo, E endógeno corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o gene endógeno, ΔC_T alvo corresponde à diferença entre o C_T do gene alvo obtido para a amostra em análise e o C_T do gene alvo obtido para a amostra controle, ΔC_T endógeno corresponde à diferença entre o C_T do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o C_T do gene endógeno obtido para a amostra controle.

Considera-se que houve uma redução ou aumento da expressão gênica, dos genes selecionados, quando o valor da expressão gênica (R) for maior que 2 ou valor de 1 quando usado a expressão de log2; abaixo a esse valor considera-se que a expressão não foi significativa.

Tabela 4: Sequência e concentração otimizada dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR em tempo real dos genes candidatos a marcadores moleculares e do gene *GAPDH* (controle endógeno).

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores (5'- 3')	Concentração otimizada
<i>GAPDH</i>	F - ACCCACTCCTCCACCTTTGA R - CTGTTGCTGTAGCAAATTCGT	0,5µM
<i>GPC3</i>	F – GTGCTTTGCCTGGCTACATC R – TCCACGAGTTCTTGTCCATTC	0,4µM
<i>CRABP2</i>	F – GACCTCGTGGACCAGAGAACTG R – CCTGGTGCACACAACGTCAT	0,8µM
<i>ADAM23</i>	F – CCACTCGATTCCAAGGGTAAAGT R ATGCAGGTGGCTTCATTACTACAC	0,4µM
<i>KTN1</i>	F- GTTTCCCCAGAAACGGAGTC R- TGTGAGCTGTTGGTTTACCG	0,5µM

Análise do Padrão de Metilação

I. Extração de DNA pela técnica do TRIzol

A extração de DNA foi realizada com o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

Para a precipitação do DNA foram adicionados 300µL de etanol absoluto gelado nos tubos de 1,5mL contendo TRIzol e amostras de tecido. As amostras foram misturadas por inversão e incubadas à temperatura ambiente (15°-30°C) durante 2 minutos, seguindo por uma centrifugação a 4°C por 10 minutos a 11.269g, o sobrenadante foi removido. Para lavagem do DNA foi adicionado 1mL da solução de citrato de sódio 0,1 M em 10% de etanol, para cada 1mL de TRIzol utilizado, aguardando por 30 minutos à temperatura ambiente com mistura periódica. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 11.269g, o sobrenadante foi descartado. A lavagem foi repetida novamente. Após a remoção da solução de citrato de sódio, foram adicionados 1,5mL de etanol 75% no DNA, seguindo por uma incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, com mistura periódica. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos a 11.269g a 4°C, o etanol foi dispensado e os tubos foram invertidos, na bancada, para secar o “*pellet*” de DNA. O DNA foi dissolvido em 100µL de água MilliQ autoclavada e incubado a 37°C a 19,5g durante 16 horas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

A concentração do DNA ($1DO_{260} = 50\mu\text{g/ml}$) foi medida pela densidade óptica, nos comprimentos de onda DO_{260} e DO_{280} . A relação ideal entre os comprimentos de onda é maior ou igual a 1,78.

Para verificar a qualidade do DNA, foi feita uma reação de PCR utilizando o gene constitutivo *β -GLOBINA*.

II. Controle da qualidade do DNA

Foi realizada uma PCR utilizando $1\mu\text{g}$ de DNA genômico em uma reação de $25\mu\text{L}$ de volume total contendo $0,1\mu\text{L}$ da enzima Taq DNA Polimerase ($5\text{U}/\mu\text{L}$), $4\mu\text{L}$ de dNTPs $1,25\text{ mM}$, $1\mu\text{L}$ de MgCl_2 (50mM), $2,5\mu\text{L}$ tampão (10X) e $0,2\mu\text{L}$ de cada oligonucleotídeos iniciadores ($10\mu\text{M}$), G73 e G74.

Os parâmetros para ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, anelamento a 55°C durante 1 minuto, e extensão a 72°C durante 1 minuto. As amostras foram submetidas a 95°C durante 1 minuto, e seguidas por uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após a reação, os fragmentos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1%, juntamente com o marcador molecular 100pb DNA Ladder (Fermentas) para verificar a amplificação de um fragmento de 315pb referente ao gene *β -GLOBINA*. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

As seqüências de bases de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento de 315 pb do gene β -*GLOBINA* está descrita a seguir:

G73: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3'

G74: 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3'

III. Extração de DNA de Linfócitos

O DNA de linfócito foi utilizado como controle positivo na análise da metilação pela técnica de MSP-PCR.

Foi coletado 8mL de sangue venoso periférico de um indivíduo, independente de sexo, idade ou raça, em tubo *vacuntainer* contendo anticoagulante (EDTA).

O sangue foi transferido para um tubo de 15mL contendo 6mL de Ficoll Paque (GE) e centrifugado a 11.269g por 30 minutos. A película de leucócitos formada entre as camadas de Ficoll Paque e de plasma foi transferida para um novo tubo em que foi adicionado PBS 1X até completar 14mL e centrifugado a 11.269g por 15 minutos. Esse último procedimento foi repetido por mais duas vezes e no final adicionou-se 1 mL de PBS 1X, 3mL de tampão de lise (TrisHCL 10mM, NaCl 400mM, Na₂EDTA 2mM), 200μL de SDS 10%, 50μL de proteinase K (20mg/mL) e 40μL de RNase-A (20mg/mL). O material foi incubado em banho-maria durante 16 horas a 37°C. Foi adicionado 1mL de NaCl 6M e a solução foi homogeneizada e mantida no gelo por 15 minutos. O material foi

centrifugado a 11.269g por 15 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo, no qual adicionou-se 10mL de etanol absoluto gelado. Após homogeneizar a solução, o DNA precipitado foi transferido para um novo tubo, de 1,5mL, contendo 500µL de etanol 70%, centrifugado a 11.269g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi invertido, na bancada, para secar o “*pellet*” de DNA. O DNA foi dissolvido em 250µL de água MilliQ autoclavada, sendo mantido em banho-maria a 37°C durante 3 dias, para completar a diluição.

A concentração do DNA ($1DO_{260} = 50\mu\text{g/ml}$) foi medida pela densidade óptica, nos comprimentos de onda DO_{260} e DO_{280} . Após determinada a concentração, o DNA de leucócitos foi submetido à metilação *in vitro*.

IV. Metilação *in Vitro*

Após a quantificação do DNA extraído de linfócito de sangue periférico, foi realizada a metilação *in vitro*, utilizando 20µg de DNA. A amostra foi incubada a 37°C durante 4 horas, em seguida foram adicionados 5µL de SAM (S-adenosilmetionato) e 12,5U de SS1 Methylase (0,625µL) (MSssI CpG Methylase-BioLabs), e novamente incubado por 4 horas a 37°C. O material foi submetido à extração com 250µL de fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugado por 15 minutos a 13.636g. Para a precipitação, foram adicionados 625µL de etanol absoluto e 85µL de acetato de amônio 7,5M à amostra, que foi incubada durante 16 horas

a -20°C. Após a precipitação, o DNA foi centrifugado por 15 minutos a 13.636g, seguido da adição de 700µL de etanol 70%. O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante, descartado, e o tubo foi invertido na bancada, para secar o “*pellet*” de DNA. O DNA foi dissolvido em 10µL de água MilliQ autoclavada.

Novamente foi medida a concentração do DNA, pela densidade óptica, nos comprimentos de onda D_{260} e D_{280} .

V. Conversão do DNA por bissulfito de sódio

Após a determinação da concentração por espectrofotometria, o DNA das amostras e o DNA de linfócito foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio para a conversão de citosina a uracila.

Dessa forma, 2µg de DNA de cada amostra foram desnaturados pela adição de 1µL de Herring Sperm DNA (10mg/mL) e 2µL de NaOH (3M) e incubado a 50 °C por 20 minutos. Subseqüentemente, o DNA foi tratado pela adição de 500µL da solução bissulfito de sódio (2,5M)/hidroquinona (1M) e aquecido a 70°C durante 3 horas em ambiente escuro. Após tratamento, foi utilizado o kit Wizard clean up (Promega) para purificação do DNA. Na etapa seguinte, o DNA foi precipitado com 5µL de NaOH (3M), 75µL de acetato de amônio (5M), 350µL de etanol absoluto gelado e 1µL de glicogênio (20mg/mL) e incubado a -20°C durante 16 horas. Após a precipitação, as amostras

foram centrifugadas por 15 minutos a 15.339g em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500µL de etanol 70% gelado. O DNA foi centrifugado novamente, o etanol foi removido e os tubos foram invertidos, na bancada, para secar o “pellet” de DNA. O DNA foi ressuspendido em 40µL de água MilliQ autoclavada.

VI. MSP-PCR

Após a conversão do DNA por bissulfito de sódio, foi realizada uma PCR em duas reações separadas, com dois pares de oligonucleotídeos diferentes, um par para seqüência metilada e um par para seqüência não metilada. As seqüências dos oligonucleotídeos foram encontradas na literatura (Verbisck et al., submetido) e estão apresentadas na Tabela 5.

As reações de amplificação para o gene ADAM23 foram processadas em um volume final de 25µL; 0,2µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL)(Invitrogen), 3,0µL dNTP (1,25mM), 2µL MgCl₂ (50mM), 2,5µL tampão (10X) e 0,75µL de cada oligonucleotídeos iniciadores (10µM).

Os parâmetros para ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C durante 45 segundos, anelamento a 59°C durante 45 segundos,

e extensão a 72°C durante 1 minuto, e a extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, para verificar o tamanho do produto amplificado e avaliar o padrão de metilação dos genes selecionados em amostras tumorais, e como controle positivo foi utilizado DNA de linfócito metilado. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com nitrato de prata. Em uma primeira etapa, os géis foram fixados em uma solução contendo etanol 10% e ácido acético glacial 0,75%, por 10 minutos, sob agitação leve e constante. Em seguida foi adicionado solução de nitrato de prata por 10 minutos, também sob agitação constante. Foi realizada uma lavagem com água destilada para a retirada do excesso de prata. Por fim, uma solução contendo hidróxido de sódio 3% e 0,3% de formaldeído foi adicionado sob agitação constante dos géis, por tempo suficiente para que as bandas fossem visualizadas. Os géis foram secos em papel celofane, contendo glicerol 10%.

Na interpretação dos resultados da eletroforese, a presença da banda na reação metilada (M) foi adotada como critério para os casos de hipermetilação, sendo assim, os casos U+M+ e U-M+ foram considerados hipermetilados e os casos U+M-, não-metilados.

Tabela5: Sequência dos oligonucleotídeos usados na reação em cadeia da polimerase específica para metilação (MSP-PCR).

Sequência dos iniciadores				Tamanho do Produto		
Gene	Sequência Metilada (5'-3')	Sequência Não-Metilada (5'-3')	T	°C		
				U	U	M
ADAM23	F : ATTGTTTTTCGTTAGAAATGTCG	F: ATTGTTTTTTTGTAGAAATGTTG	59°	100pb	100pb	100pb
	R: TAAAAAACAACAAAAACCGAACG	R: TAAAAAACAACAAAAACCAACA				

T= temperatura de anelamento (°C), U= Sequência não- metilada, M= Sequência metilada
Referência: ADAM23, Verbisck et al., submetido.

Análise Estatística

Para avaliar se existe associação entre a redução de expressão gênica e o estadiamento tumoral, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal Wallis. Antes de analisar dos dados de expressão, foi realizado um teste de Normalização para saber se os valores de expressão apresentam uma distribuição normal (Curva de Gauss) entre si, ou seja, se não há valores muito discrepantes. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. Para avaliar a associação entre o padrão de metilação do gene *ADAM23* e os dados clínicos de cada paciente, foi utilizado o teste Exato de Fisher. Como critério de significância foi utilizado o valor de $P < 0,05$.

As análises estatísticas foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. José Antônio Cordeiro do Departamento de Epidemiologia e Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

Resultados

Dados Clínicos

Do total dos 35 pacientes analisados, todos possuíam tanto amostra de carcinoma renal de células claras, quanto amostras de córtex renal normal.

Segundo os dados clínicos dos 35 pacientes, 54% (19) eram do sexo masculino e 46% (16) do sexo feminino, com idade variando de 23 a 79 anos sendo a média de 57,54 anos. Quanto à etnia, 83% (29) dos indivíduos estavam classificados como brancos, 3% (1) como negro e 14% (5) como pardos. Em relação ao estadiamento TNM, 11,5% (4) dos indivíduos apresentaram linfonodos comprometidos, e 20% (7) metástases, conforme a Tabela 2.

Análise da Expressão Gênica

I. Seleção das amostras

Para analisar a expressão dos genes selecionados, foi extraído o RNA das 35 amostras obtidas de carcinoma renal de células claras e 35 amostras de córtex renal normal.

A Figura 9 mostra a qualidade do RNA, evidenciando a presença das subunidades ribossômicas 28S e 18S. Dessa forma, as três últimas amostras possuem RNA de boa qualidade, devido à presença das duas subunidades ribossômicas, diferentemente da primeira, no qual não foi possível visualizar as bandas, pois o RNA estava degradado.

A degradação do RNA pode ter ocorrido devido à conservação ou manipulação inadequada durante a coleta e processamento da amostra. Como o RNA é uma molécula muito instável, a conservação do tecido em temperaturas abaixo de -80°C , e a adequada manipulação do material durante a coleta e o processo de extração, são pontos críticos para a obtenção de RNA de boa qualidade.

Após verificar a qualidade do RNA, foi realizada a síntese de cDNA no qual as amostras apresentaram RNA de boa qualidade. A etapa seguinte constituiu na validação do cDNA das amostras por amplificação do gene *β -ACTINA*, que serve como controle para transcritos abundantes, visualizadas em gel de agarose 1% (Figura 10).

Assim, as amostras selecionadas para validação dos possíveis marcadores foram compostas por 35 amostras de carcinoma renal de células claras e um pool de amostras de córtex renal normal.

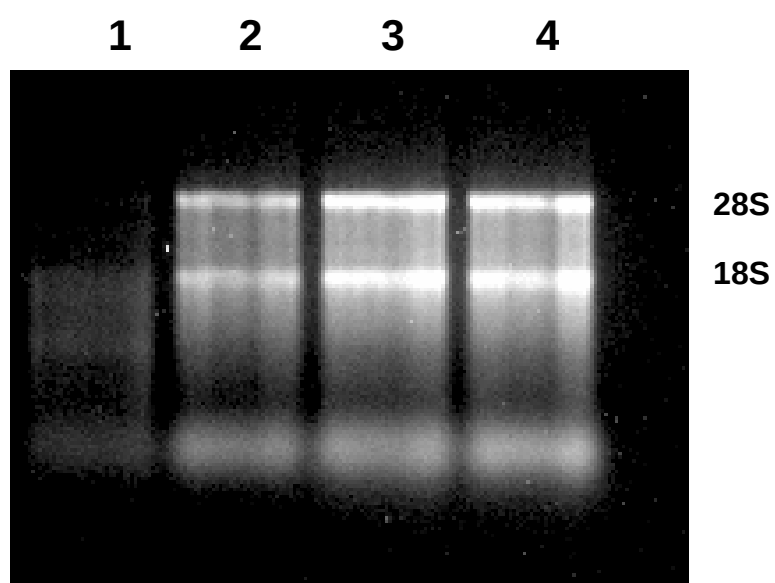


Figura 9: Avaliação da qualidade da extração do RNA por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo. As canaletas 1 e 3 correspondem às amostras de córtex renal normal, e as canaletas 2 e 4 às amostras tumorais.

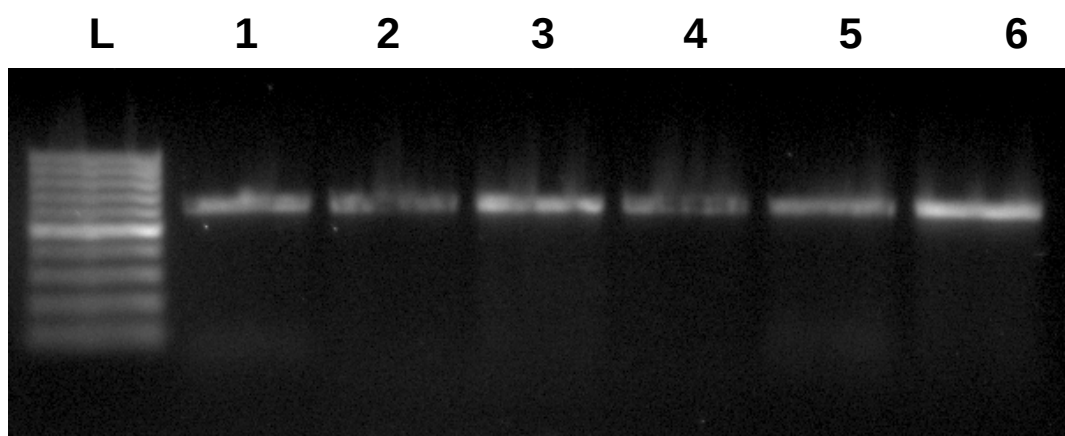


Figura 10: Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação do *gene β-ACTINA* (613pb) nas amostras de cDNA. As canaletas 1, 2, 3, 5 e 6 correspondem às amostras tumorais, e a 4, à amostra de córtex renal normal. L= Ladder (marcador de peso molecular de 100pb).

II. Seleção do genes por SAGE *in Silico*

As análises de SAGE digital foram realizadas utilizando os dados obtidos de duas bibliotecas de SAGE – a biblioteca de tumor SAGE_Kidney_carcinoma_B_D2, originária de um carcinoma em transição com grau de diferenciação III-IV de uma mulher de 73 anos e a biblioteca controle, SAGE_Kidney_normal_B_1, obtida de um rim normal de uma mulher de 53 anos. Após as análises realizadas com o auxílio do programa GDM, os genes candidatos foram submetidos às análises no programa SAGE Anatomical viewer (Figura 11) para avaliação da expressão em diferentes tecidos e tumores. A expressão gênica diferencial foi também avaliada por Northern virtual (Figura 12) e confirmada com dados de *microarrays* realizados para diferentes linhagens celulares, entre elas linhagens de tumores renais (Figura 13).

Os resultados obtidos demonstraram alterações na expressão de genes participantes de importantes vias metabólicas que supostamente contribuem para o estabelecimento e manutenção do fenótipo tumoral. Baseando-se nessas análises, os genes *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*, foram selecionados para os experimentos de validação experimental da expressão gênica em amostras tumorais de carcinoma renal.

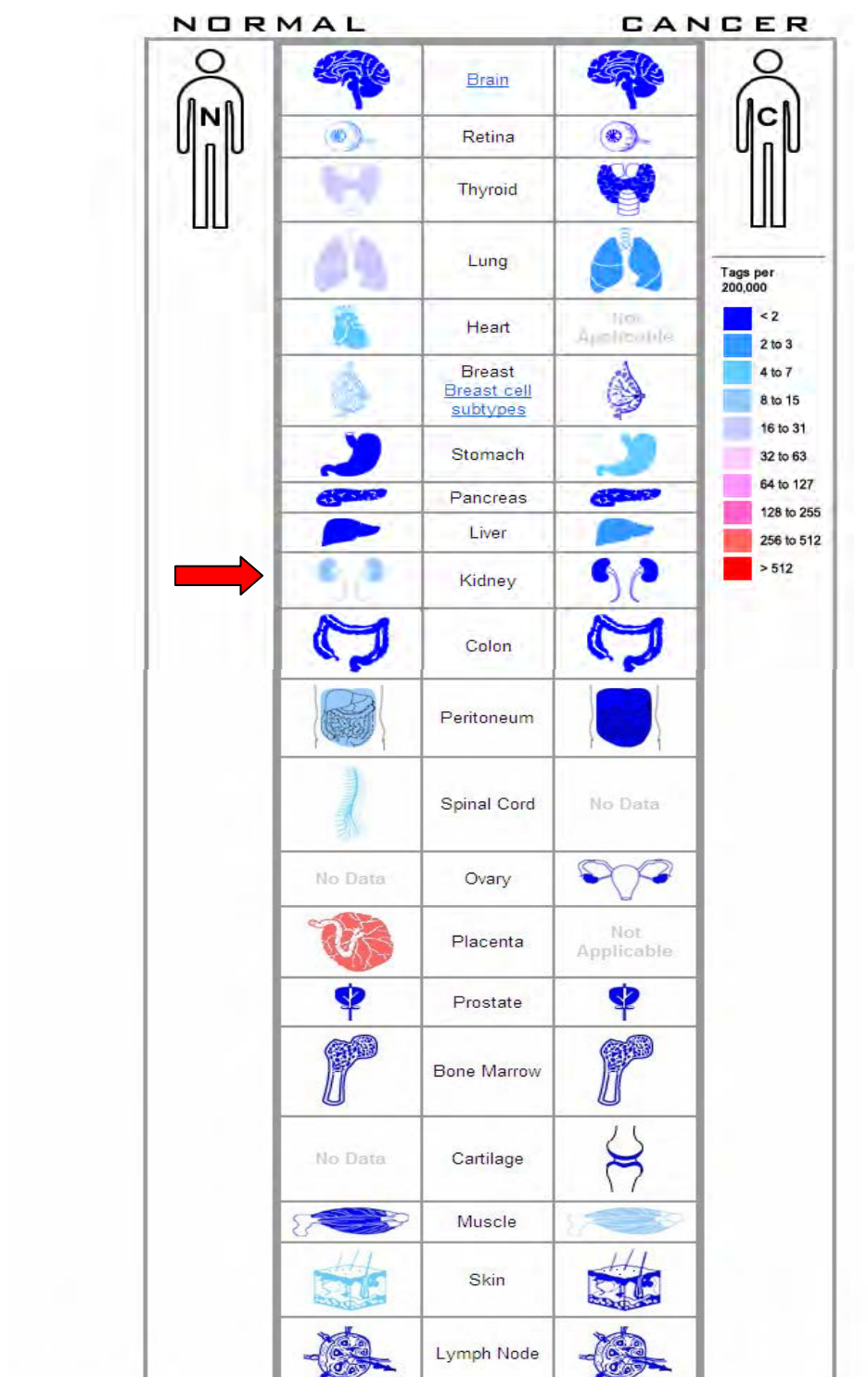


Figura 11: Análise virtual do gene *KTN1* pelo programa SAGE Anatomic Viewer demonstrando a expressão gênica diferencial entre tecidos normais e tumorais. (➡) Superexpressão do gene no rim normal em relação aos dados da biblioteca de SAGE tumoral.



Figura 12: Confirmação da expressão diferencial do gene *GPC3* entre tecidos normais e tumorais por Northern digital. O nível de expressão gênica pode ser determinado por dados de EST e por bibliotecas de SAGE.

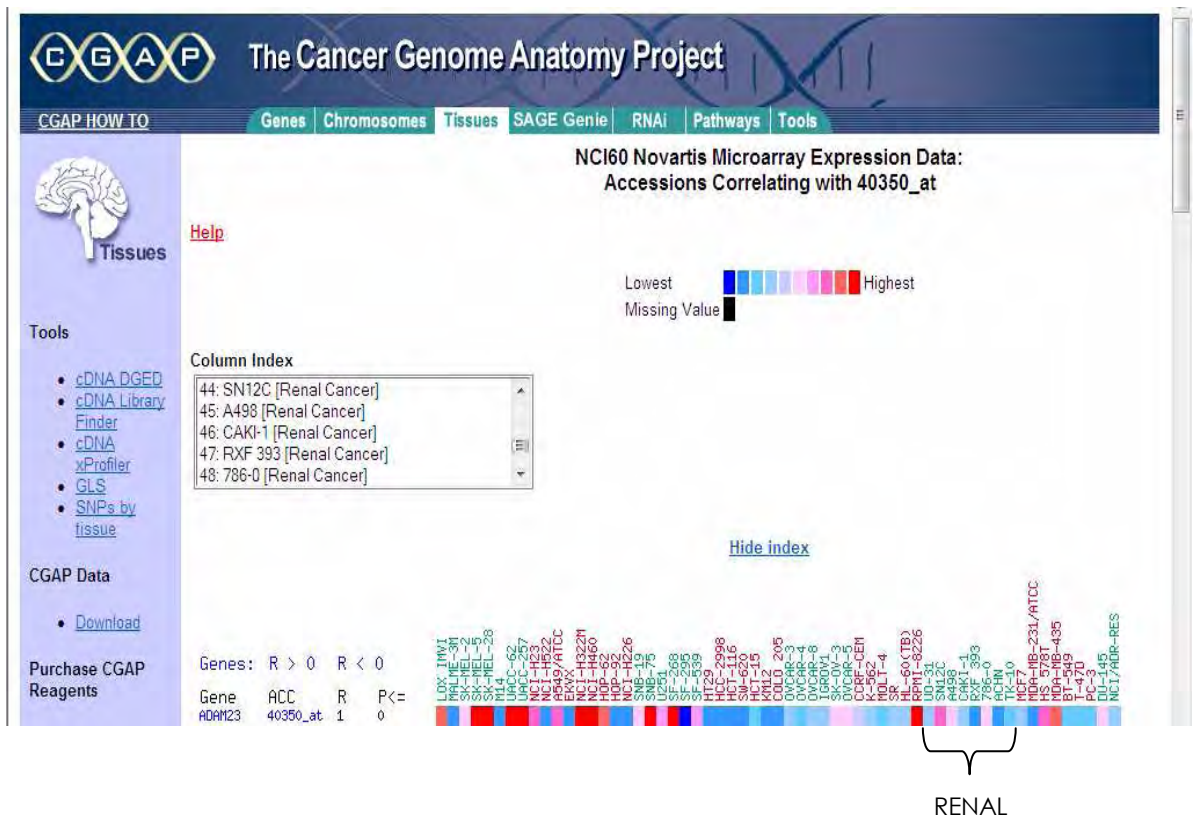


Figura 13: Dados de microarray digital demonstrando a expressão gênica diferencial do gene *ADAM23* em diferentes linhagens celulares tumorais.

Validação da Expressão Gênica

A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para validar os candidatos a marcadores moleculares na carcinogênese renal. Os referidos genes são: *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*.

Para avaliar a expressão de um gene alvo, foi utilizado o método de quantificação relativa em relação a um gene endógeno (gene normalizador das reações), o gene *GAPDH*. Os genes alvos apresentaram uma eficiência de amplificação dentro do limite estabelecido (96% a 107%), conforme a Tabela 6.

Todos os genes apresentaram evidência de baixa expressão gênica nas amostras tumorais quando comparados com as amostras normais (Figura 14).

O gene *GPC3* apresentou uma redução de expressão significativa em 34 das 35 amostras (97%) de carcinoma renal de células claras analisadas, quando comparada com o *pool* de amostras de córtex renal normal, com uma variação de 3 a 9 vezes menos expresso (Figura 15). A Figura 16 mostra a análise da expressão gênica de *GPC3* em cada estágio tumoral, no qual não foi observado evidência de associação entre redução da expressão gênica e o estadiamento tumoral ($P=0,137$).

O gene *CRABP2* apresentou uma redução de expressão significativa em 30 (85%) das 35 amostras de carcinoma renal de células claras quando comparadas ao *pool* de córtex renal normal, com uma

variação de 1 a 5 vezes menos expresso (Figura 17). A Figura 18 mostra a análise da expressão gênica de *CRABP2* em cada estágio tumoral, no qual não foi observado evidência de associação entre a redução da expressão gênica e o estadiamento tumoral ($P=0,142$).

O gene *KTN1* apresentou uma redução de expressão significativa em 21 (60%) das 35 amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao *pool* de amostras de córtex renal normal, com uma variação de 1 a 4 vezes menos expresso (Figura 19). A Figura 20 mostra a análise da expressão gênica do *KTN1* em cada estágio tumoral, no qual não foi observado evidência de associação entre a redução da expressão gênica e o estadiamento tumoral ($P=0,369$).

O gene *ADAM23* apresentou uma redução de expressão significativa em 24 (68,5%) das 35 amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao *pool* de amostras de córtex renal normal, com uma variação de 2 a 6 vezes menos expresso. (Figura 21). A Figura 22 mostra a análise da expressão gênica do *ADAM23* em cada estágio tumoral, no qual foi observado evidência de associação entre a redução da expressão gênica e o estadiamento tumoral ($P=0,004$).

Tabela 6: Valor do slope e eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Slope	Eficiência de Amplificação	% da Eficiência
<i>GAPDH</i>	-3,285	2,01	101%
<i>GPC3</i>	-3,41	1,96	96%
<i>CRABP2</i>	-3,285	1,96	96%
<i>ADAM23</i>	-3,3	2,01	101%
<i>KTN1</i>	-3,2	2,07	107%

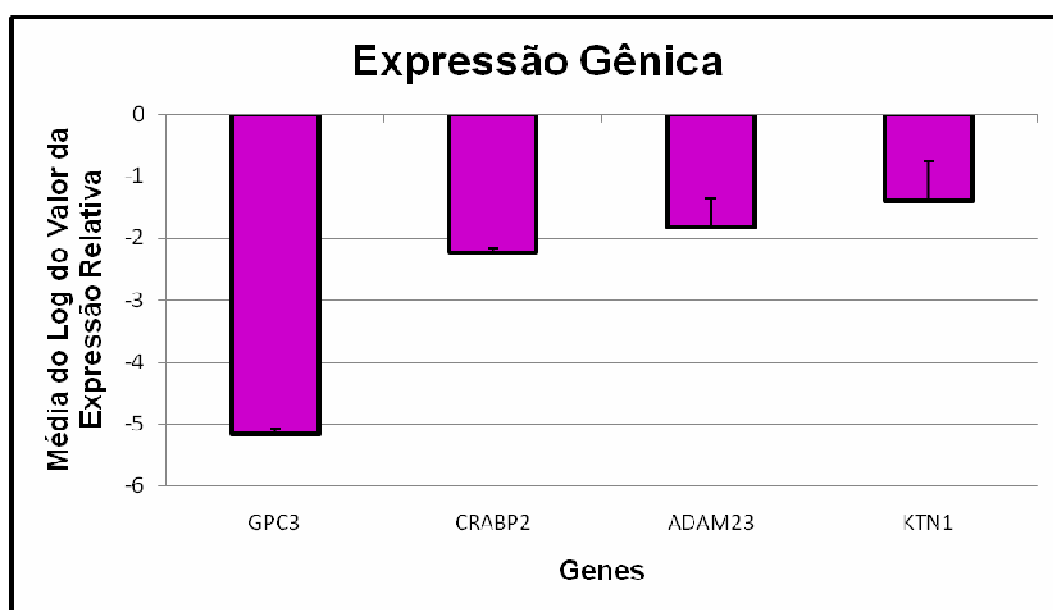


Figura 14: Média do valor da expressão gênica em log2 dos genes *GPC3*, *CRABP2*, *ADAM23* e *KTN1*, em amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao pool de córtex renal normal.

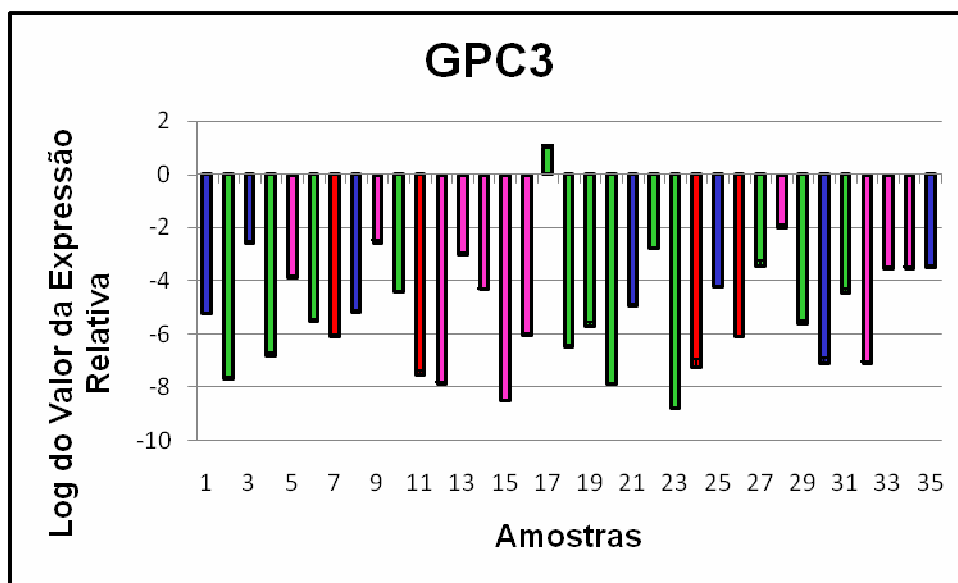


Figura 15: Valor da expressão gênica em log2 do gene *GPC3* em amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao pool de amostra de córtex renal.

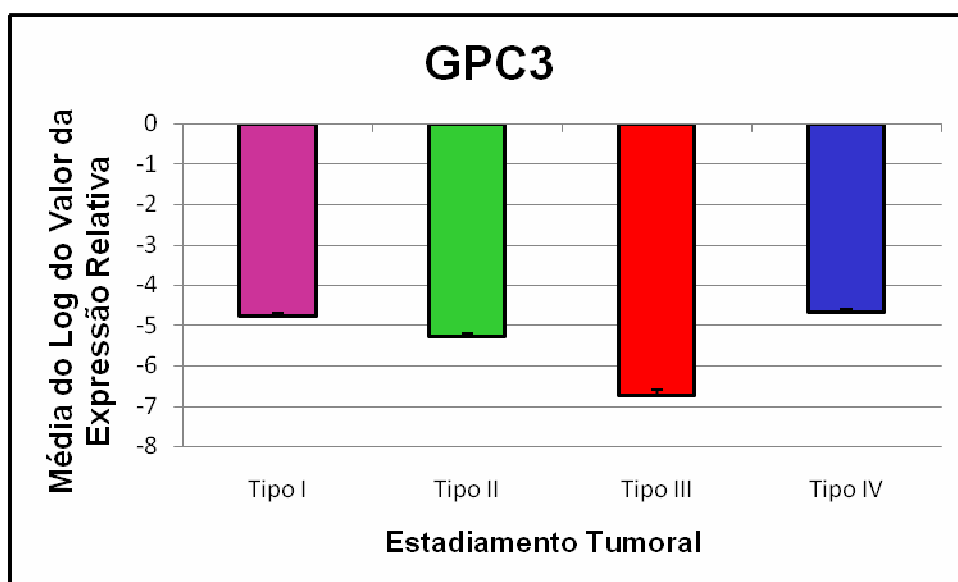


Figura 16: Média do valor da expressão gênica em log2 do gene *GPC3* em cada estágio tumoral

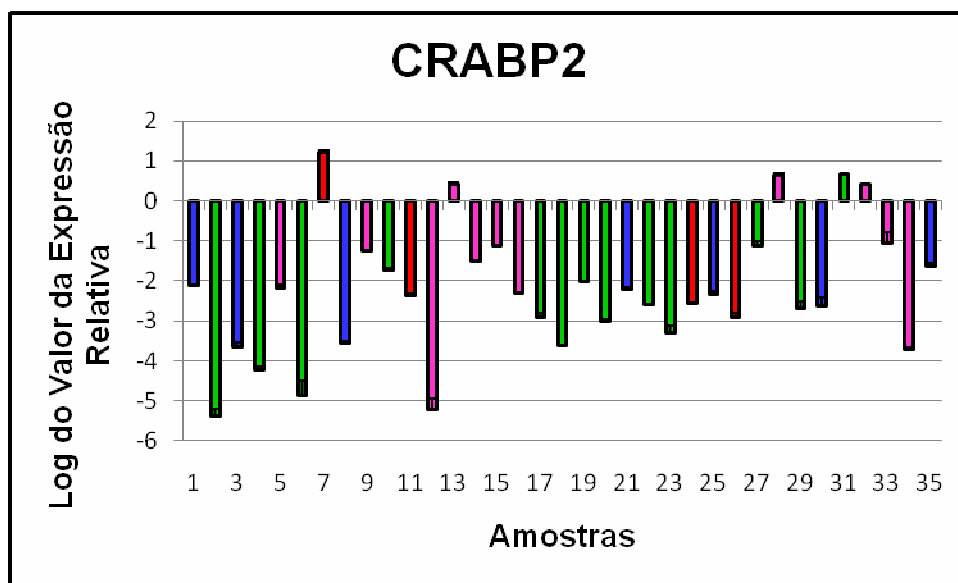


Figura 17: Valor da expressão gênica em log2 do gene *CRABP2* em amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao pool de amostras de córtex renal.

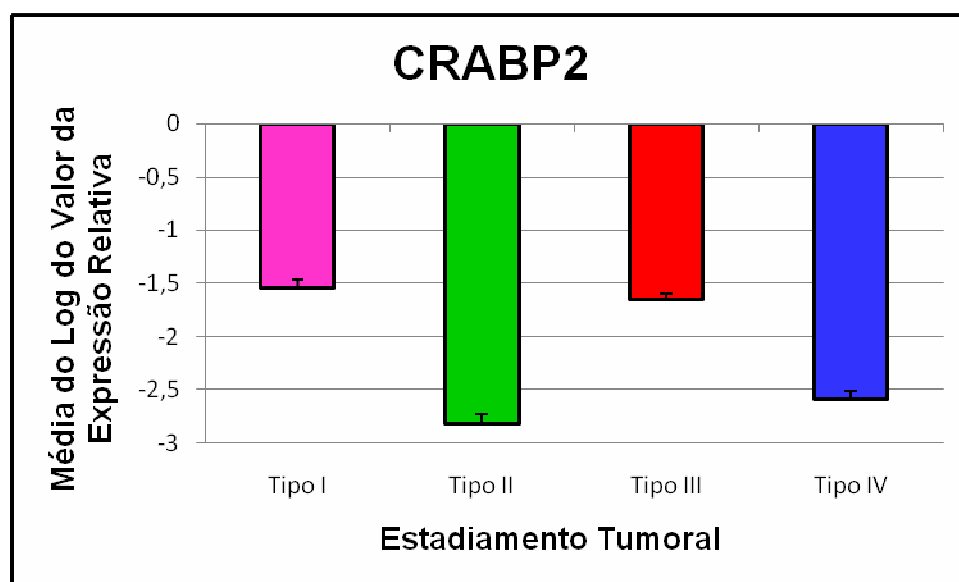


Figura 18: Média do valor da expressão gênica em log2 do gene *CRABP2* em cada estágio tumoral

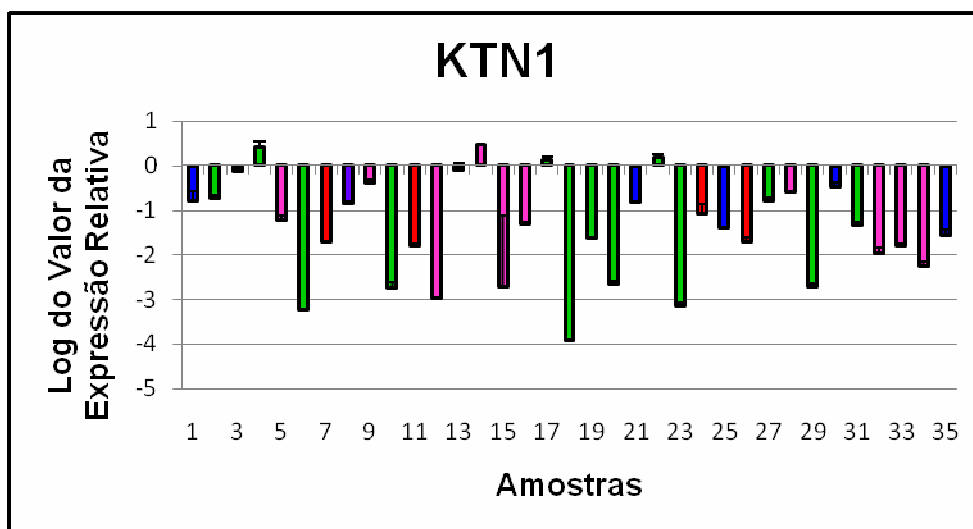


Figura 19: Valor da expressão gênica em log2 do gene *KTN1* em amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao pool de amostras de córtex renal normal

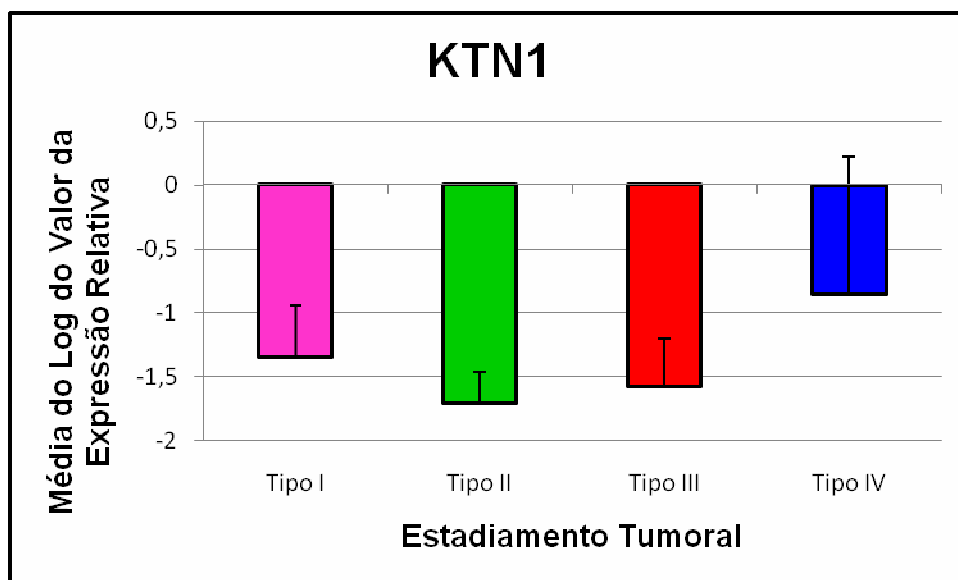


Figura 20: Média do valor da expressão gênica em log2 do gene *KTN1* em cada estágio tumoral.

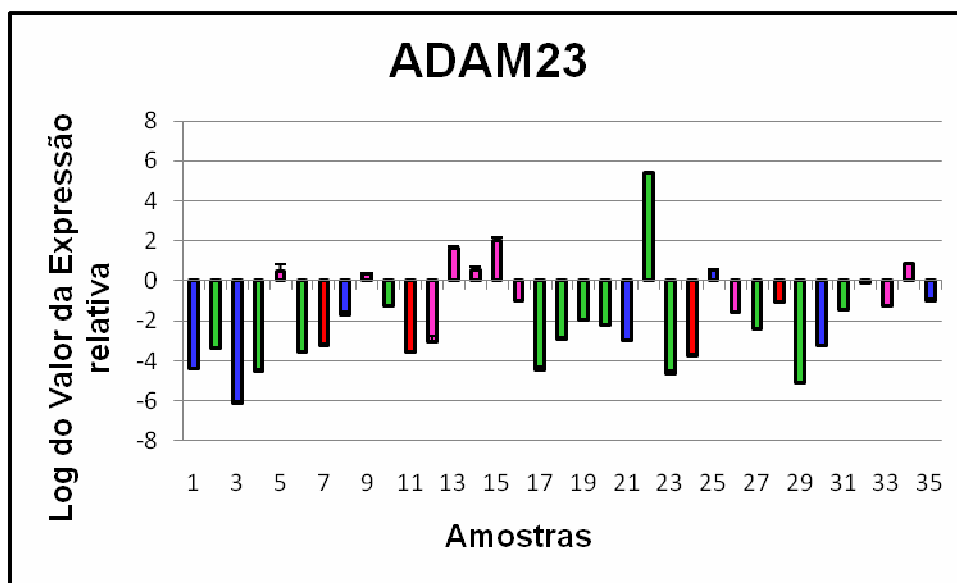


Figura 21: Valor da expressão gênica em log2 do gene *ADAM23* em amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao pool de amostras de córtex renal.

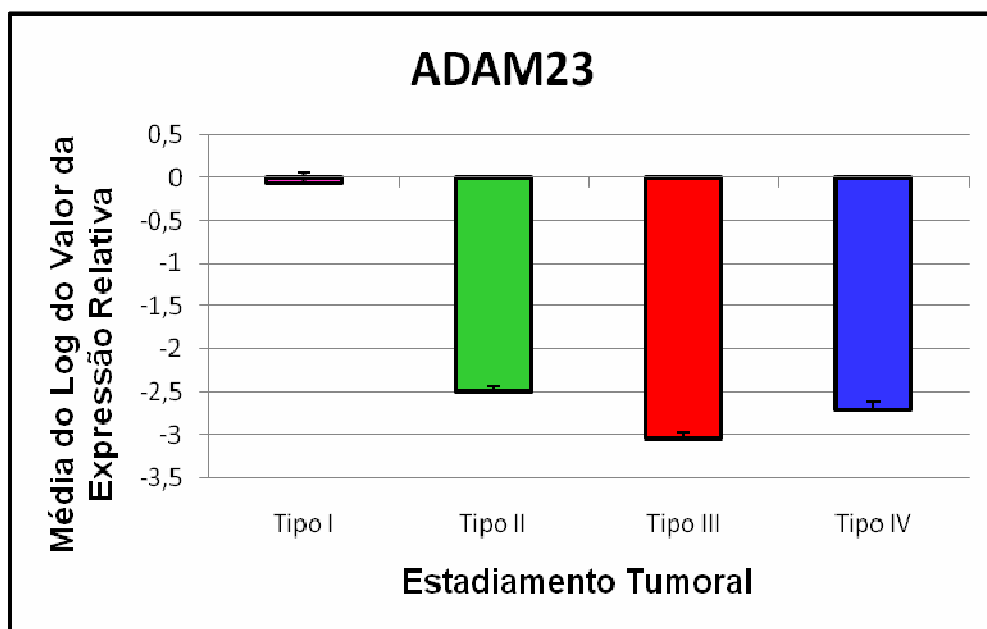


Figura 22: Média do valor da expressão gênica em log2 do *ADAM23* estágio tumoral.

Análise do Padrão de Metilação por MSP-PCR

Após verificar a expressão dos genes alvos, *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*, os quais apresentaram uma redução da expressão em amostras tumorais, e associar esta expressão com o estágio tumoral, a etapa seguinte constitui na análise do padrão de metilação pela técnica MSP-PCR. Foi realizada MSP apenas para o gene *ADAM23*, pois este foi o único gene que apresentou uma evidência de associação significativa entre o estadiamento tumoral e a redução da expressão gênica.

Foram extraídos DNA de 35 amostras de carcinoma renal de células claras. Posteriormente foi realizada uma reação de PCR do gene *β -GLOBINA*, para verificar a qualidade do DNA. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1% (Figura 23).

Após verificar a qualidade do DNA, foi realizado o tratamento de bissulfito de sódio, seguido da reação de PCR com primers específicos para sequência metilada e não-metilada. Pela técnica de MSP-PCR realizada para o gene *ADAM23*, os produtos amplificados consistem em 100pb para ambas as seqüências metilada e não-metilada.

A hipermetilação do gene *ADAM23* foi observada em 31 (88,5%) das 35 amostras tumorais analisadas. Dentre as quatro (11,5%) amostras tumorais não-metiladas, duas pertencem ao estágio tumoral TI, e duas ao TII. Todas as amostras metiladas apresentaram bandas nas reações

metilada e não metilada (U+M+), as amostras não metiladas apresentaram bandas apenas na reação não-metilada(U+M-) (Figura 24).

A tabela 8 (Anexo B) mostra as amostras tumorais metiladas para gene *ADAM23*.

Não foi observada evidência de associação significativa entre a hipermetilação do *ADAM23* com os dados clínicos dos pacientes: estadiamento tumoral ($P=0,79$), sexo ($0,855$), idade ($P=0,308$), etnia ($P=0,55$), etilismo ($P=1,00$) e recidiva ($P=1,00$).

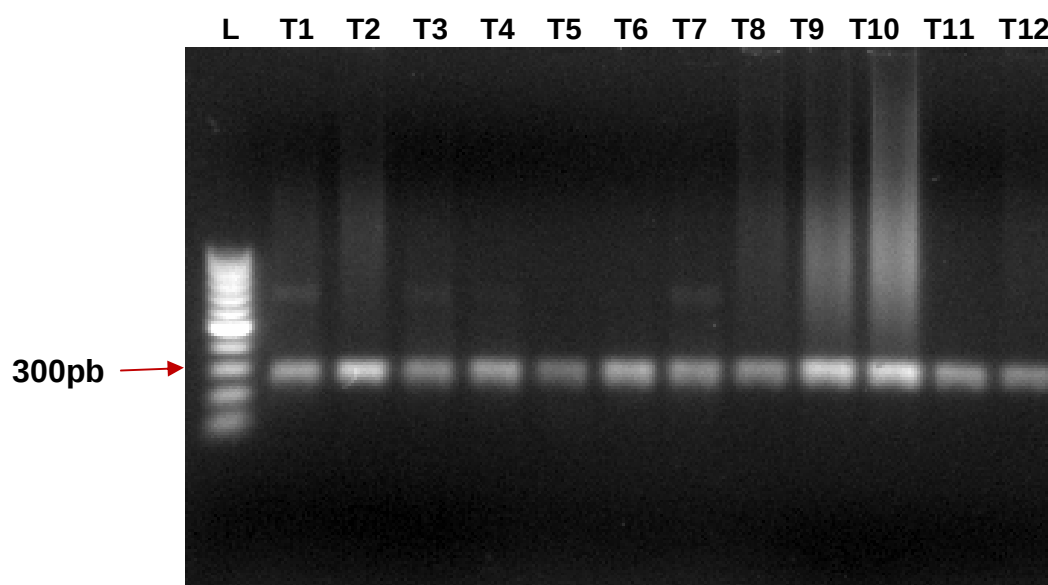


Figura 23: Gel de agarose 1% evidenciando a amplificação DNA pelo do gene β -*GLOBINA* (315pb) nas amostras tumorais. L= Ladder (marcador de peso molecular de 100pb), T= amostra carcinoma renal de células claras.

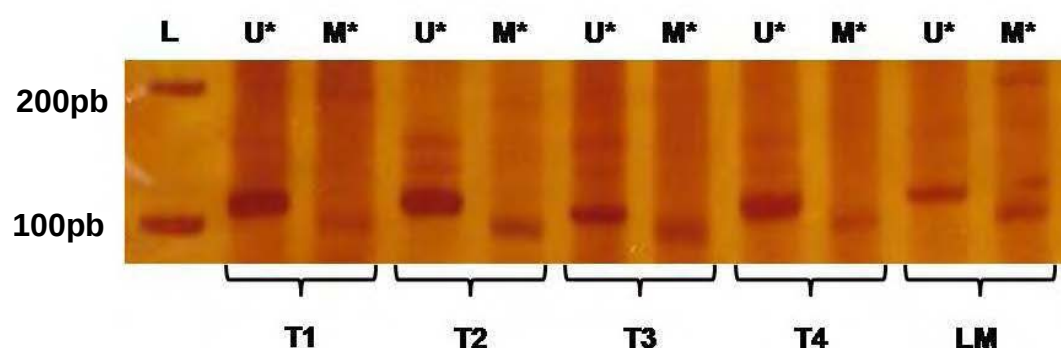


Figura 24: Gel de poliacrilamida 8% evidenciando o padrão de bandas do gene *ADAM23* após a técnica de MSP-PCR. L= Marcador molecular de 100pb; U= reação para seqüência não metilada; M= reação para seqüência metilada, T= amostras tumorais; LM= linfócito metilado (controle positivo); U+M+ = amostra metilada.

Discussão

O tumor renal é um tumor raro que acomete 2% de todos os tumores malignos. Este tumor afeta mais os homens que as mulheres, e é mais freqüente em indivíduos com idade avançada, média de 65 anos de idade (WOOD et al., 2007). A incidência desta doença vem aumentando nas ultimas décadas (COSTA, DRABKIN, 2007). É uma doença histologicamente heterogênea, sendo o subtipo histológico mais comum, o carcinoma renal de células claras, que compreende 80-85% dos casos de tumores renais (PETRELLA, BRINCKERNOFF, 2006; NELSON et al., 2007) A etiologia do carcinoma renal de células claras ainda é desconhecida, entretanto, vários fatores de risco têm sido associados com a alta incidência desta doença, dentre eles, tabaco, consumo de álcool, obesidade, hipertensão, entre outros (LABER, 2006; BALDEWIJNS et al., 2008).

O tratamento ocorre, principalmente, por nefrectomia e imunoterapia, que são modalidades terapêuticas bem estabelecidas, entretanto, a incidência de metástases em pacientes tratados é alta, apresentando uma expectativa de vida de 12 meses (CHO et al., 2008).

Apesar de muitos parâmetros clínicos serem utilizados na prática clínica, a previsão de um bom resultado pós-cirúrgico ou uma terapia sistêmica é bastante limitado, por isso há necessidade de novas pesquisas e abordagens sobre o carcinoma renal, bem como da busca de novos marcadores de prognóstico e tratamento (TAN et al., 2008).

Sendo assim, alguns genes têm sido identificados, por meio da análise da expressão gênica, para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese renal e posteriormente serem utilizados como potenciais alvos terapêuticos.

Dentre os genes depositados em banco de dados, neste trabalho foi analisada a expressão gênica dos genes *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23* por PCR em Tempo Real, e verificar se a expressão destes é regulada por hipermetilação na região promotora, potencializando a capacidade desses genes atuarem como marcadores tumorais.

A metilação do DNA é o principal evento epigenético que ocorre em humanos. A importância da epigenética no processo da tumorigênese vem se destacando nas últimas décadas, e tem sido aceita como uma alternativa para as mutações e deleções associadas à perda de função dos genes, que podem proporcionar uma vantagem às células neoplásicas (BALDEWIJNS et al., 2008).

As mudanças que ocorrem no padrão de metilação têm um importante papel na iniciação e progressão tumoral. Essas mudanças estão especificamente associadas com ativação ou silenciamento gênico. A hipermetilação de ilhas CpGs na região promotora de vários genes, em particular os genes supressores de tumor, está correlacionada com perda da expressão gênica (CALMON et al., 2007).

A existência de metilação no DNA genômico é uma característica de células cancerosas. Muitos dos genes silenciados por este

mecanismo epigenético estão envolvidos na regulação do ciclo celular, reparo de danos no DNA, apoptose, angiogênese e invasão tumoral (MULERO-NAVARRO, ESTELLER, 2008). Os padrões alterados de metilação, na região promotora de múltiplos genes, têm sido empregados como biomarcadores moleculares em vários tipos de tumores.

Os marcadores tumorais têm sido muito utilizados para diferenciar lesões malignas a partir das benignas, diagnóstico, prognóstico, resposta ao tratamento, além de detectar recidivas (NAKATSURA et al. 2004).

Pela análise da expressão gênica, foi observado que os genes selecionados neste trabalho apresentaram expressão reduzida no tecido de carcinoma renal de células claras quando comparado com córtex renal normal.

O gene *GPC3* mostrou redução da expressão significativa em 34 (97%) amostras de tecido neoplásico, comparado ao controle. Não foi observada associação entre o estágio tumoral e a expressão gênica. Esse gene codifica a proteína glipicana 3, membro de uma família de glipicanas, um grupo de proteoglicanos de heparina sulfatadas que se liga à superfície celular pela via do glicosilfosfatidilinositol, particularmente expressa em tecido embrionário e fetal. A função bioquímica do *GPC3*, uma proteína de membrana extracelular altamente glicosilada, ainda não está muito bem esclarecida. Os

proteoglicanos são moléculas altamente interativas, importantes nos processos de migração, crescimento e adesão celular, cruciais no desenvolvimento da tumorigênese (SAIKALI et al., 2000).

Esses proteoglicanos de heparina sulfatada são bem conhecidos por interagir com fatores de crescimento por meio das cadeias de heparina sulfatadas e pela regulação desses fatores ligados à heparina, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e WNTs. Até o presente momento não é conhecido o modo pelo qual os fatores de transcrição são regulados por este gene, e nem o seu papel no desenvolvimento da carcinogênese (HISHIMUNA et al., 2006; OTA et al., 2006).

Embora esta proteína seja altamente expressa em carcinoma hepatocelular, apresenta-se hipoexpressa em vários tipos de câncer e linhagens celulares, incluindo mesotelioma, tumores ovarianos e de mama; o que implica em um importante papel no potencial de proliferação celular (WANG et al., 2006).

A perda de função ou a redução da expressão gênica de *GPC3* pode resultar no crescimento celular descontrolado e contribuir para o fenótipo maligno de alguns tumores (ZYNGER et al., 2006). Segundo Xiang e colaboradores (2001), o silenciamento da expressão do gene *GPC3*, em tumores de mama, é resultado da hipermetilação de sua região promotora, como descrito para câncer de ovário e mesotelioma, considerado importante na regulação negativa do crescimento celular.

Estudos *in vitro* têm mostrado que esse gene induz apoptose em certas linhagens celulares, indicando que o mesmo possa funcionar como inibidor da proliferação celular e supressor tumoral em linhagens celulares tipo-específicas, atuando como um potencial marcador molecular em heparocarcinoma (WANG et al., 2008).

O *GPC3* já foi encontrado hipoexpresso em carcinoma renal de células claras, segundo Takahashi e colaboradores (2001); entretanto ainda não há relatos sobre qual o mecanismo que atua sobre esse gene causando o silenciamento gênico, permitindo assim, o crescimento descontrolado de células tumorais neste tipo de carcinoma.

O efeito de expressão de *GPC3* pode depender do tipo celular , e em particular, da presença de certos fatores de crescimento. Entretanto, estudos adicionais são necessários para compreender quais os mecanismos genéticos responsáveis pela perda de função desse gene (SAIKALL, SINNE, 2000).

O gene *CRABP2* mostrou uma redução da expressão significativa em 30 (85%) amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparada com amostras de córtex renal normal. Não foi observada associação entre estágio tumoral e a redução da expressão gênica. O *CRABP2* codifica uma proteína ligante de ácido retinóico celular, responsável pelo transporte de ácido retinóico do citoplasma ao núcleo (SALAZAR et al., 2007). O ácido retinóico (RA), modulador da

diferenciação e proliferação celular e apoptose, apresenta atividade anti-carcinogênica em vários tipos de tumores, embora sua capacidade de supressão tumoral não esteja completamente compreendida; pode decorrer devido à função da regulação transcricional e transdução de sinais (MANOR et al., 2003; DONATO, NOY, 2005).

O ácido retinóico pode inibir a proliferação de vários tipos de tumores celulares, como o carcinoma celular escamoso de cabeça e pescoço, tumor pulmonar, câncer de próstata e câncer cervical. Esse retinóide, mediado pela proteína *crabp2*, pode ser usado como agente quimioterápico e quimiopreventivo para pacientes com tumores sólidos (UCHIDA et al., 2001). A expressão reduzida do gene *CRABP2* dificulta o transporte do ácido retinóico ao núcleo, podendo impedir a sua atuação no controle da proliferação celular.

O efeito da expressão da proteína *crabp2* foi investigado por Manor e colaboradores (2003), e foi observado que sua expressão inibe o crescimento de células tumorais, ao contrário do que encontrado em carcinoma renal de células claras, onde o tecido neoplásico apresentou uma expressão reduzida deste gene. Esse gene também foi identificado com baixa expressão em câncer de próstata e câncer de cabeça e pescoço (THOMPSON et al., 2008).

O gene *CRABP2* é considerado o principal regulador da atividade anti-carcinogênica do ácido retinóico, podendo atuar como um

marcador de diagnóstico e uma ferramenta terapêutica para câncer de próstata (OKUDUCU e tal., 2005).

Até o presente momento não havia estudos sobre a expressão gênica do *CRABP2* em carcinoma renal de células claras. A baixa expressão desse gene, nas amostras tumorais, pode estar relacionada com o mecanismo de hipermetilação de ilhas CpGs em sua região promotora.

O gene *KTN1* apresentou uma redução de expressão significativa em 21 (60%) das 35 amostras tumorais de analisadas, quando comparadas ao córtex renal normal. Não foi observada associação significativa entre o estágio do tumor e a redução da expressão gênica. Esse gene codifica uma proteína integral, a kinectina, encontrada no retículo endoplasmático. Essa proteína é expressa no cérebro, fígado, ovário e células hematopoiéticas, e atua como receptor para kinesina, uma proteína envolvida no transporte de vesículas ao longo de microtúbulos (XU et al., 2001; HIRANO et al., 2004).

A kinectina possui uma função importante como vesícula de transporte por sua atuação de receptor para kinesina e dineína, auxiliando o movimento dessas proteínas motoras dentro da célula. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual as células controlam o transporte de vesículas ainda não está claro (TRAN et al., 2002)

Além de interagir com a kinesina, a kinectina também interage com outras proteínas, como a proteína Rho, que forma o complexo Rho-

kinectina, responsável pelo transporte de microtúbulos entre os filamentos de actina, e com o fator de alongação da tradução-10 (HOTTA et al., 1996; ONG et al., 2006).

O fator de alongação da tradução-10 desempenha uma função importante na regulação da síntese de proteínas que participam da fase de alongação durante a tradução do RNAm. Segundo Bai e colaboradores (2006) o silenciamento da expressão gênica do *KTN1* não tem efeito sobre a síntese protéica. Alguns estudos sugerem que a tradução de proteínas transportadas por vesículas secretoras é regulada com a biogênese de grânulos secretores, pela estabilização do mRNA.

A função exata do gene *KTN1* e sua atuação na progressão tumoral ainda permanecem obscuras. Ainda não há relatos, na literatura, sobre qual mecanismo possa ser responsável pela baixa expressão desse gene em carcinoma renal de células claras. Assim, podemos inferir que um dos mecanismos que possa atuar na regulação da expressão gênica é a hipermetilação de ilhas CpGs em sua região promotora.

O gene *ADAM23* apresentou uma redução de expressão significativa em 24 (68,5%) amostras tumorais, quando comparadas ao *pool* de córtex renal normal. Foi observada uma evidência de associação entre estágio tumoral e redução da expressão gênica. Esse gene codifica um membro da família de proteína *adam*, que é composta por dois domínios, desintegrina e metaloprotease, e está envolvida em importantes processos biológicos envolvendo interações célula-célula e célula-matriz,

e atividade de protease (COSTA et al, 2005). Essas interações são conhecidas por determinarem adesão, migração e proliferação celular, diretamente envolvidos no desenvolvimento e progressão tumoral (COSTA et al., 2004)

Esse gene apresenta baixa expressão em alguns tipos de tumores, como o tumor cerebral e o câncer de mama. Isso ocorre devido a hipermetilação de ilhas CpGs em sua região promotora. Assim, com a perda da adesão celular as células malignas podem escapar de seu sítio de origem, degradar a matriz extracelular, invadir tecidos e metastisar (COSTA et al., 2004; COSTA et al., 2005).

Em câncer de cabeça e pescoço o *ADAM23* também apresentou baixa expressão, devido ao mecanismo de hipermetilação da região promotora. Calmon e colaboradores (2007) observaram evidência significativa entre o mecanismo de hipermetilação desse gene e o estágio tumoral avançado, ou seja, quanto mais avançado o estágio do tumor, menor é a expressão desse gene. Em câncer de mama também foi observado um alto padrão de metilação do *ADAM23* com estágio avançado do tumor (COSTA et al., 2005).

Em carcinoma renal de células claras, a redução da expressão gênica do *ADAM23* está intimamente relacionada com o estadiamento tumoral, no qual amostras de pacientes de estágio II, III e IV apresentaram uma expressão mais baixa em relação ao estágio I. Esses dados corroboram a hipótese de Takada e colaboradores

(2005), de que a perda de expressão do *ADAM23* tem um importante papel nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, e pode ser essencial na progressão tumoral, como ocorre em câncer gástrico.

Assim, inferimos que o gene *ADAM23* pode ser considerado um possível marcador molecular de prognóstico em carcinoma renal de células claras, já que a redução de sua expressão gênica está fortemente ligada ao estadiamento do tumor.

O silenciamento transcricional desse gene pelo mecanismo de hipermetilação têm sido observado em vários tipos de tumores, como câncer de mama, de cabeça e pescoço, e do cérebro (COSTA et al., 2005; CALMON et al., 2007).

Vários estudos de análise do perfil de metilação do DNA têm sido realizados em carcinoma renal. A metilação aberrante do DNA é uma alteração molecular muito comum em neoplasias, e está sendo investigada como marcador molecular em carcinoma renal (GONZALGO et al., 2004; DALGIN et al., 2007;).

Pela primeira vez, foi estudado o processo de hipermetilação de ilhas CpGs na região promotora do *ADAM23* em carcinoma renal de células claras

O desenvolvimento dessa técnica tem simplificado os estudos de genes inativados por hipermetilação em neoplasias humanas, devido à sua simplicidade, especificidade e sensibilidade (CALMON et al., 2007).

Nesse trabalho, foi observado uma alta frequência de hipermetilação do *ADAM23* em amostras tumorais. A hipermetilação desse gene esteve presente em 31 (88,5%) das 35 amostras de carcinoma renal de células claras analisadas. Entretanto, não foi observada nenhuma evidência de associação entre a presença de hipermetilação e o estadiamento do tumor.

Em alguns estudos realizados com outros tipos de tumores, como o câncer gástrico, de cabeça e pescoço, e de mama, foi observada uma forte associação entre hipermetilação na região promotora desse gene e o avanço do estágio tumoral, sugerindo que o *ADAM23* possa atuar como um marcador de prognóstico (COSTA et al., 2005; CALMON et al., 2007).

A partir dos resultados obtidos, podemos hipotetizar que com o avanço do estadiamento tumoral, em carcinoma renal de células claras, aumenta o número de células metiladas, o que pode ocasionar em interações célula-célula anômalas e favorecer migração celular durante a progressão tumoral, contribuindo com a redução da expressão gênica (COSTA et al., 2005)

Podemos inferir que o evento epigenético de hipermetilação de ilhas CpG s na região promotora é responsável pelo silenciamento da expressão gênica do *ADAM23*, em carcinoma renal de células claras.

Desse modo, vale ressaltar a importância de analisar a expressão gênica e dos mecanismos responsáveis pela inativação transcricional

dos genes *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23*, estudados pela primeira vez em carcinoma renal, e *GPC3*, pois podem atuar como marcadores moleculares e fornecer informações relevantes para o conhecimento e desenvolvimento do carcinoma renal de células claras.

Conclusão

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. Os genes selecionados, *GPC3*, *CRABP2*, *KTN1* e *ADAM23* apresentam redução de expressão significativa em amostras de carcinoma renal de células claras, quando comparadas ao *pool* de amostras de córtex renal normal.
2. Não há evidência de associação entre a redução da expressão gênica dos genes *GPC3*, *CRABP2* e *KTN1*, em amostras tumorais, e o estadiamento tumoral.
3. Há evidência de associação entre a redução da expressão do gene *ADAM23*, em amostras tumorais, e o estágio tumoral.
4. O gene *ADAM23* encontra-se hipermetilado em frequência elevada, nas amostras de carcinoma renal de células claras.
5. Não há evidência de associação entre a metilação da região promotora do *ADAM23* e os dados clínicos dos pacientes.

Referências Bibliográficas

BAI, J. Z. et al. Kinectin participates in microtubule-dependent hormone secretion in pancreatic islet β -cells. **Cell Biology International**, v.30, p.885-894, 2006

BALDEWIJNS, M. M. L. et al. Genetics and epigenetics of renal cell cancer. **Biochimics et Biophysica Acta**, v.1785, p. 133-155, 2008.

BASTIAN, P. et al. Molecular Biomarker in Prostate Cancer : The Role of CpG Island Hypermethylation. **European Urology**, v. 46, p. 698-708, 2004.

BAUMHOER, D. et al. Glypican-3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic and neoplastic tissues. **American Journal Clinical Pathology**, v. 129, p. 899-906, 2008.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 2, p. 4-11, 2005.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis. Epigenetics joins genetics. **TIG**, v. 16, p.168-174, 2000.

BAYLIN, S.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer- a mechanism for early oncogenic pathway addiction. **Natural Review Genetic**, v. 6 (2), p. 107-116, 2006).

BEISLAND, C. et al Multiple primary malignancies in patients with renal cell carcinoma: a national population-based cohort study. **BJU International**, v. 97, p. 698-702, 2006.

BESTOR, T. H. Gene silencing. Methylation meets acetylation. **Nature**, v. 393, p. 311-312, 1998.

BODMER, D. et al. Understanding familial and non-familial renal cell cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 11, p. 2489-2498, 2002.

BOON, K. et al. An anatomy of normal and malignant gene expression. **PNAS**, v. 99 (17), p. 11287-11292, 2002.

BYUN, S. S. et al. Expression of Survivin in Renal Cell Carcinomas: Association with Pathologic Features and Clinical Outcome. **Urology**, v. 69, p. 34–37, 2007.

CALMON, M. F. et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1 and ADAM23 in head and neck cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.173, p. 31-37, 2007.

CASCÓN, A. et al. Loss of the Actin Regulator HSPC300 Results in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Protection in Von Hippel-Lindau Patients. **Human Mutation**, v. 0, p. 1-9, 2007.

CHO, K. S. et al. A comprehensive prognostic stratification for patients with metastatic renal clear cell carcinoma. **Yonsei Medical Journal**, v. 49(3), p. 451-458, 2008.

CHOUERI, T. K.; BUKOWSKI, R. M.; RINI, B. I. The current role of angiogenesis inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. **Seminars in Oncology**, v. 33, p. 596-606, 2006.

CLARK, S. J.; WARNECKE, P. M. DNA methylation analysis in mammalian cells. **Methods**, v.21, p. 99-100, 2002.

COSTA, F. F. et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v.23, p. 1481-1488, 2004.

COSTA, F. F. et al. ADAM23 mehtylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters**, v. 380, p. 260-264, 2005.

COSTA, L. J.; DRABKIN, H. A. Renal cell carcinoma: New development in molecular biology and potential of target therapies. **The Oncologist**, v.12, p. 1404-1415, 2007.

COTTRELL, S. E. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 595-604, 2004.

DALGIN, G. S. et al, Identification of Novel Epigenetic Markers for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **The Journal of Urology**, v.180, p. 1126-1130, 2008.

DRUCKER, B. J. Renal Cell Carcinoma: Current Status and Future Prospects. **Cancer Treatment Reviews**, v. 31, p. 536-545, 2005.

DONATO, L. J.; NOY, N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. **Cancer Research**, v.65(18), p. 8193-8199, 2005.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **Journal of Pathology**, v. 196, p. 1-7, 2002.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomesand histone-modification maps. **Nature Reviews**, v. 8, p. 286-298, 2007.

ESTELLER, M. Epigenetics in Cancer. **The New England Journal of Medicine**. V. 358, p. 1148-59, 2008.

EVERTS, H. B. et al. Immunolocalization of enzymes binding proteins and receptors sufficient for retinoic acid synthesis and signaling during the hair cycle. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1593-1604, 2007.

FAZZARI, M. J.; GREALLY, J.M. Epigenomics: Beyond CpG Islands. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 446-455, 2004.

FICARRA, V. et al. Risk stratification and prognostication of renal cell carcinoma. **World Journal of Urology**, v. 26, p. 115-125, 2008.

FRIGOLA, J. et al. Methylome profiling of cancer cells by amplification of enter-methylated sites (AIMS). **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 1-7, 2002.

FRUHWALD, M. C.; PLASS, C. Global and Gene-Specific Methylation Patterns in Cancer: Aspects of Tumor Biology and Clinical Potential. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 75, p. 1-16, 2002.

FURGE, K. A. et al. Combining differential expression chromosomal and pathway analyses for the molecular characterization of renal cell carcinoma. **Canadian Urological Association Journal**, v. 1, p. 521-527, 2007.

GARG, M. et al. Spermatogenesis-Associated Antigen 9 Is Associated With Tumor Growth, Migration, and Invasion in Renal Cell Carcinoma. **Cancer Research**, v. 68 (20), p. 8240-8, 2008.

GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous

system neurons. *Journal of Neuroscience Research*, v. 78, p. 647-658, 2004.

GONZALGO, M. L. et al. Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 1;10 (21), p. 7276-83, 2004.

GRONBAEK, K.; HOTHER, C.; JONES, P. A. Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, v.115, p. 1039-1059, 2007

HA, P. K.; CALIFANO, J. A. Promote methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **The Lancet Oncology**, v. 7, p. 77-82, 2006.

HASS, N. B.; UZZO, R. G. Target therapies for kidney cancer urologic practice. **Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 25, p. 42-432, 2007.

HIRANO, N. et al. Presence of anti-kinectin and anti-PMS1 antibodies in Japanese aplastic anaemia patients. **Brithsh Journal of Haematology**, v. 128, p. 221-223, 2004.

HIROTA, E. et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 29, p. 799-827, 2006.

HISHINUMA, M. et al. Hepatocellular oncofetal protein glypican 3 is a sensitive marker for α -fetoprotein producing gastric carcinoma. **Histopathology**, v. 49, p. 479-486, 2006

HOTTA, K. et al. Interaction of the Rho family small G proteins with kinectin an anchoring protein of kinesin motor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 225, p. 69-74, 1996.

HUANG, D. et al. Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium- stimulated K562 cell proliferation. **Toxicology Letters**, v. 179(1), p. 43-47, 2008.

ISSA, J. P. CpG island methylation phenotype in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 988-993, 2004.

JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Journal of Cancer Clinicians**, v. 58, p. 71-96, 2008.

JIA, H. L. et al. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 1133-1139, 2007

JONES, P. A. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, V. 983, p.213-219, 2003.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 415-428, 2002.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**, v. 128, p. 683-692, 2007.

KARAKIEWICZ, P.; HUTTER, G. C. Predicting cancer-control outcomes in patintes with renal cell carcinoma. *Currente Opinion in Urology*, v. 17, p. 295-302, 2007.

KATOH, M. et al. Developmentally Regulated DNA Methylation in *Dictyostelium discoideum*. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 18-25, 2006.

KWACK, M. H.; CHOI, B. Y.; SUNG, Y. K. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells. **Molecules and Cells**, v. 21 (2), p. 224-228, 2006.

KLATTE, T. et al. Surveillance for renal cell carcinoma: why and how? When and how often?. **Urological Oncology**, v. 26 (5), p. 550-4, 2008.

KWACK, M. H.; CHOI, B. Y.; SUNG, Y. K. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells. **Molecules and Cells**, v. 21(2), p. 224-228, 2006.

LABER, D. Risk Factors, Classification and Staging of Renal Cell Cancer. **Medical Oncology**, v. 23, p. 443-454, 2006.

LANG, K. et al. The Burden of Illness Associated with Renal Cell Carcinoma in the United States. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 25, p. 368–375, 2007.

LIPWORTH, L.; TARONE, R. E.; MCLAUGHLIN, J. K. The Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. **The Journal of Urology**, v. 176, p. 2353-2358, 2006.

LUCZAK, M. W.; JAGODZINSKI, P. P.; The role of DNA methylation in cancer development. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 44 (3), p. 143-154, 2006.

MAI, K. T. et al. Cytohistopathologic hybrid renal cell carcinoma with papillary and clear cell features. **Pathology-Research and Practice**, v. 202, p. 863-868, 2006.

MANOR, D. et al. Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein II. **Cancer Research**, v. 63, p. 4426-4433, 2003.

MARTIGNONI, G.; et al. Role of Molecular Markers in Diagnosis and Prognosis of Renal Cell Carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, v. 28, p. 1-9, 2006.

MIDORIKAWA, Y. et al. Glypican-3, Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma, Modulates FGF2 and BMP-7 signaling. **International Journal Cancer**, v. 103, p. 455-465, 2003.

MILLER, W. H. The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. **Cancer**, v. 83(8), p. 1471-1482, 1998.

MOMPARLER, R.; BOVENZI, V. DNA Methylation and Cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v.183, p. 145-154, 2000.

MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, p.1-11, 2008.

NAKATSURA, T. et al. Identification of glypican 3 as a novel tumor marker for melanoma. **Clinical Cancer Research**, v.10, p. 6612-6621, 2004.

National Center for Biotechnology Information. **Entrez Gene**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>>. Acesso 05 de janeiro 2009.

NELSON. E. C.; EVANS, C. P.; LARA, P. N. Renal cell carcinoma: Current status and emerging therapies. **Cancer Treatment Reviews**, 2007.

NEPHEW, K. P.; HUANG, T. H. M. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. **Cancer Letters**, v. 190, p. 125-133, 2003.

NG, C. S. et al. Renal Cell Carcinoma: Diagnosis, Staging, and Surveillance. **AJR**, v.191, p. 1220-1232, 2008

OKUDUCU, A. F. et al. Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. *International Journal of Oncology*, v. 27(5), p. 1273-82, 2005.

ONG, L. L. Kinectin anchors the translation elongation factor-1 δ to the endoplasmatic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278(34), p. 32115-32123, 2003.

ONG, L. L. et al. Kinectin-dependent assembly of translation elongation factor-1 complex on endoplasmatic reticulum regulates protein synthesis. **The Journal of Biologicalchemistry**, v. 281(44), p. 33621-33634, 2006.

OTA, S. et al. Oncofetal protein glypican-3 in testicular germ cell tumor. **Virchows Arch**, v. 449, p. 308-314, 2006.

PALUSZCZAK, J.; BAER-DUBOWSKA, W. Epigenetic diagnostics of cancer – the application of DNA methylation markers. **J. Aool Genetic**, v.47 (4), p. 365-375, 2006.

PATARD, J. J.; et al. Target Therapy in Renal Cell Carcinoma. **World Journal of Urology**, v. 26, p.135-140, 2008.

PETRELLA, B. L.; BRINCKERHOFF, C. E.; Tumor Cell Invasion of Von Hippel Lindau Renal Cell Carcinoma Cells is Mediated by Membrane

Type-I Matrix Metalloproteinase. **Molecular Cancer**, v. 5:66, p. 1-14, 2006.

PFAFFL, M. W, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29(9), p. 2002-2007, 2001.

PLASS, C. Cancer Epigenomics. **Human Molecular Genetics**, v. 11(20), p. 2479-2488, 2002

PULIDO E. G.; et al. Biología Molecular del Carcinoma de Células Claras Renales: Principios para un Tratamiento Selectivo. **Actas Urológicas Españolas**, v. 31, p. 1-11, 2007.

REUTER, C. W. et al. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF)-receptor-signaling in renal cell carcinoma. **World Journal of Urology**, v. 25, p.59-72, 2007.

RODENHEISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical application. **CMAJ**, v. 174(4), p. 341-348, 2006.

SAIKALI, Z.; SINNE, T. T. D. Expression of Glypican 3 (GPC3) in embryonal tumors. **International Journal of Cancer**, v. 89, p. 418-422, 2000.

SALAZAR, J. et al. Association of a polymorphism in the promoter of the cellular retinoic acid-binding protein II gene (CRABP2) with increase circulating low-density lipoprotein cholesterol. **Clinical Chemical Laboratory Medicine**, v.45(5), p. 615-620, 2007.

SANTOS, K. F.; MAZZOLA, T. N.; CARVALHO, H. F. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1531-1541, 2005.

SANTOS, M. L. Análise de expressão gênica diferencial em linhagem celulares de mama com diferentes perfis de expressão de *ERBB2* na presença e ausência de docetaxel. Tese (Doutorado). Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2006.

SAWHNEY, R.; KABBINAVAR, F. Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Current Urology Reports*, v. 9. P. 26-33, 2008.

STIGLIANO, I. et al. Glypican-3 regulates migration, adhesion and actin cytoskeleton organization in mammary tumor cells through Wnt signaling modulation. **Breast Cancer Research Treatment**, 2008.

STRAUSBERG, R. L. et al. In Silico analysis of cancer through the Cancer Genome Abatomy Project. **TRENDS in Cell Biology**, v.11 (11), p.S66-S71, 2001

SUN, Y. et al. ADAM 23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Neurochemical*, v. 32, p. 1217-1223, 2007.

SUNG, Y. K., et al. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Science**, v. 94, p. 259-262, 2003

TAKADA, H. et al. ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancer by homozygous deletion or abarrent promoter hypermethylation. **Oncogene**, v. 24, p. 8051-60, 2005.

TAKAHASHI, M. et al. Gene Expression Profiling of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Gene Identification and Prognostic Classification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 9754-9759, 2001.

TAN, X. et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear cell renal carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 123, p. 1080-1088, 2008.

TAWFIK, O. W. et al. Prognostic Significance of CD44, Platelet-Derived Growth Factor Receptor α , and Cyclooxygenase 2 Expression in Renal Cell Carcinoma. **Arch Pathol Lab Med**, v. 131, p. 261–267. 2007.

THOMPSON, R. H. et al. Dynamic Outcome Prediction in Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated With Radical Nephrectomy: The D-SSIGN Score. **The Journal of Urology**, v. 177, p. 477-480, 2007.

THOMPSON, M. et al. Identification of candidate prostate cancer genes through comparative expression profiling of seminal vesicle. **The Prostate**, v. 68, p. 1248-1256, 2008.

TING, A. H.; MCGARVERY, K. M.; BAYLIN, S. B. The cancer epigenome-competents and functional correlates. **Genes & Development**, v. 20, p. 3215-3231, 2006.

TRAN, H. et al. Integrin clustering induces kinectin accumulation. **Journal of cell Science**, v. 15, p. 2031-2040, 2002.

UCHIDA, D. et al. Low-dose retinoic acid enhances in vitro invasiveness of human oral squamous cell carcinoma cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 85(1), p. 122-128, 2001.

VAISSIÈRE, T.; SAWAN, C.; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutation Research**, v. 659, p. 40-48, 2008.

VELCULESCU, V. E. Serial Analysis of Gene Expression. **Science**, v. 270, p. 484-487, 1995.

VUCIC, E. A.; BROWN, C. J.; LAM, W. L. Epigenetics of cancer progression. **Pharmacogenomics**, v. 9(2), p. 215-234, 2008.

WANG, X. Y. et al Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. **Human Pathology**, v. 37, p. 1435-1441, 2006.

WANG, H.; ZHENG, H.; AZUAJE, F. Clustering-based approaches to SAGE data mining. **BioData Mining**, v.1:5, p. 1-12, 2008.

WOOD, L. S. Managing the Complex Journey of Renal Cell Carcinoma. **Spotlight on Symposia from the ONS 32nd Annual Congress in Las Vegas, NV**, 2007.

WOODWARD, E. R. et al Familial Clear Cell Renal Cell Carcinoma (FCRC): Clinical Features and Mutation Analysis of the VHL, MET and CUL2 Candidates Genes. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, p. 348-353, 2000.

WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 31, p. 443-449, 2002.

XIANG, Y. Y.; LADEDA, V.; FILMUS, J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 7408-7412, 2001.

XU, J. et al. Molecular cloning and characterization of fox testis kinectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 37-42, 2002.

ZBAR, B. et al. Familial Renal Carcinoma: Clinical Evaluation, Clinical Subtypes and Risk of Renal Carcinoma Development. **The Journal of Urology**, v. 177, p. 461-465, 2007.

ZYNGER, D. L. et al. Glipican3: a novel marker in testicular germ cell tumors. **American Journal of Sirurgical Pathology**, v. 30, p. 1570-1575, 2006.

Anexos

Anexo A – Termo de Informação e Consentimento



FUNDAÇÃO
PIO XII

Hospital de Câncer de Barretos

Termo de Informação e Consentimento

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, o corpo clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, em tumores, de novos genes cu lesões em genes já existentes. Estes estudos são realizados em fragmentos de tumores removidos em cirurgias, ou em material biológico colhido.

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e /ou tratamento de alguma forma de tumor. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade de remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à enfermidade. É prática rotineira deste Hospital usar parte do tumor e/ou material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado, ou do material biológico, não é utilizado, sendo então congelado e armazenado para novos exames se necessários. Caso contrário, são descartados, conforme legislação sanitária regulamentar sobre o assunto.

A obtenção e o estudo dos referidos fragmentos de tumor e material biológico não implicarão em riscos adicionais no seu tratamento ou na sua cirurgia, nem tampouco, em aumento no tempo da operação ou na extensão da mesma. O projeto de pesquisa proposto que vier utilizar este material será previamente apresentado à apreciação da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital.

O fragmento de tumor e/ou material biológico será identificado no laboratório por um código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identificação serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso do material para os fins acima descritos, é necessário esclarecê-lo(a) que não existem quaisquer benefícios ou direitos financeiros a receber sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, no seu tratamento.

Caso você ainda tenha questões a fazer sobre este termo de consentimento ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética Médica, pelo telefone (17) 3321-6600.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário. Somente assine este termo, se consentir.

Declaração

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com todo o teor.

Barretos, _____ de _____ de _____

Responsável ou Paciente

Nome: _____

R.G.: _____ RGH: _____

Anexo B

Tabela 8: Padrão de metilação do gene ADAM23 em amostras tumorais.

Amostras	Metilação	Estágio	Sexo	Idade	Etnia	Etilismo	Recidiva
T1	Sim	TIV	M	58	B	Não	Sim
T2	Sim	TII	F	39	P	Não	Não
T3	Sim	TIV	F	71	B	Não	Não
T4	Sim	TII	F	64	B	Não	Não
T5	Sim	TI	M	46	B	Não	Não
T6	Sim	TII	M	70	B	Não	Não
T7	Sim	TIII	M	70	B	Sim	Não
T8	Sim	TIV	F	58	P	Sim	Não
T9	Sim	TI	M	36	B	Não	Não
T10	Sim	TII	M	48	N	Sim	Não
T11	Sim	TIII	M	52	B	Não	Não
T12	Sim	TI	F	62	P	Não	Não
T13	Sim	TI	M	75	B	Não	Não
T14	Sim	TI	F	49	B	Não	Não
T15	Não	TI	F	71	B	Não	Não
T16	Sim	TI	F	79	B	Não	Não
T17	Sim	TII	F	29	B	Não	Não
T18	Sim	TII	M	70	B	Não	Sim
T19	Não	TII	M	39	B	Não	Não
T20	Sim	TII	M	66	B	Sim	Não
T21	Sim	TIV	M	77	B	Não	Sim
T22	Não	TII	F	23	P	Não	Não
T23	Sim	TII	F	53	B	Não	Não
T24	Sim	TIII	M	69	B	Não	Não
T25	Sim	TIV	F	60	P	Não	Não
T26	Sim	TIII	F	79	B	Não	Não
T27	Sim	TII	F	59	B	Não	Não
T28	Sim	TI	F	64	B	Não	Não
T29	Sim	TII	M	53	B	Sim	Não
T30	Sim	TIV	M	56	B	Sim	Não
T31	Sim	TII	M	54	B	Não	Não
T32	Não	TI	M	52	B	Sim	Não
T33	Sim	TI	M	67	B	Sim	Não
T34	Sim	TI	M	41	B	Não	Não
T35	Sim	TIV	F	55	B	Não	Não