



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉ VAN HELVOORT LENGERT

**“ANÁLISE DA METILAÇÃO DOS GENES *GSTP1* E *MGMT* E  
DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*,  
*CYP1A1* E *MGMT* COMO MARCADORES MOLECULARES  
DO CÂNCER DE BEXIGA”**

ANDRÉ VAN HELVOORT LENGERT

**“ANÁLISE DA METILAÇÃO DOS GENES *GSTP1* E *MGMT* E  
DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*,  
*CYP1A1* E *MGMT* COMO MARCADORES MOLECULARES  
DO CÂNCER DE BEXIGA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos  
Cólus

Londrina  
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L566a Lengert, André van Helvoort.  
Análise da metilação dos genes GSTP1 e MGMT e de polimorfismos dos genes  
GSTP1, GSTT1, GSTM1, CYP1A1 e MGMT como marcadores moleculares do  
câncer de bexiga / André van Helvoort Lengert. – Londrina, 2012.  
74 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual  
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética  
Biologia Molecular, 2012.

1. Bexiga – Câncer – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) – Teses. 3. Marcadores  
biológicos de tumores – Teses. 4. DNA – Teses. 5. Genética – Expressão – Teses.  
I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.  
III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 575.173

ANDRÉ VAN HELVOORT LENGERT

**“ANÁLISE DA METILAÇÃO DOS GENES *GSTP1* E *MGMT* E DE  
POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP1A1* E  
*MGMT* COMO MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER DE  
BEXIGA”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Patricia Pintor dos Reis  
UNESP – São Paulo - SP

---

Profa. Dra. Roberta Losi-Guembarovski  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2012

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho é fruto de pesquisas realizadas ao longo dos anos de 2010 e 2011 no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina.

À minha gratidão abrange uma lista maior do que a usual em uma seção de agradecimentos devido às inúmeras pessoas que foram essenciais para a concretização deste.

Muitos amigos e colegas participaram direta ou indiretamente deste trabalho, mas todos foram fundamentais: Rafael Kcond; Vitor; Bruno; André Soldado; Rafaela; Chuck; Gringo; Adriano; Rogério; Luana; Heloísa; Marcelo; Diego; Maressa; Valéria; Lara; Milene; Ana Flávia; Lucas; Adeline e Dimitrius, que colaboraram muito nas extrações; Rossana, que na reta final me deu força e sofreu junto comigo e com os *primers*; Marilesia, que foi meu braço direito e muitas vezes o esquerdo tanto nos experimentos quanto nas coletas; Hellen e Mariana que não mediram esforços para colaborar mesmo à distância.

Meu mais profundo muito obrigado a todos vocês.

Ao longo de todo o projeto contei ainda com o apoio do Hospital do Câncer de Londrina e Hospital Universitário da UEL e de toda a equipe de médicos urologistas, em especial Dr. Paulo Emílio Fuganti, Gustavo Marconi, Luis Gustavo Toledo, Marco Aurélio de Freitas Rodrigues, Emerson Pereira Gregório e Ricardo Brandina, toda a equipe de enfermeiros, auxiliares, e todos os funcionários que sempre asseguraram o bom andamento das coletas e entrevistas.

Além disso, agradeço à clínica UROLIT, CISMEDPAR (Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema), Irmandade da Santa Casa de Londrina, e UNOPAR em especial à Dra. Regina Célia Poli-Frederico pelo gentil fornecimento de amostras.

Agradeço ainda ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e aos inúmeros funcionários da Universidade Estadual de Londrina que

colaboraram gentilmente de alguma forma com este projeto. Cito em especial: Dário, Melissa e Sueli. Cada um auxiliou e desdobrou-se da maneira que pôde.

À banca examinadora foi selecionada com muito carinho. Agradeço a cada um dos integrantes que dispuseram de seu tempo para ler, corrigir e contribuir com o presente trabalho.

Sou grato também, ao indispensável apoio financeiro fornecido pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PQ).

Algumas pessoas merecem ainda uma menção especial:

À amiga, professora e orientadora Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus, que é uma pessoa incrível tanto dentro quanto fora do laboratório, e sempre se doa de corpo, mente e coração a cada um de seus alunos. Você tem minha sincera admiração e respeito.

Meus pais Cristovão e Jeanne e meu irmão Felipe, me deram apoio intelectual e emocional durante todo o meu mestrado, e foram essenciais em exatamente cada parte deste trabalho. Tenho muita sorte em tê-los comigo.

Por último gostaria de agradecer a todos os pacientes que mesmo em um momento difícil aceitaram participar desta pesquisa. Eles são a razão fundamental de todo este trabalho que não termina aqui.

LENGERT, André van Helvoort. **Análise da metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT* e de polimorfismos dos genes *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTMI*, *CYP1A1* e *MGMT* como marcadores moleculares do câncer de bexiga**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

O câncer de bexiga é o segundo tipo de tumor mais frequente encontrado no sistema urinário. No Brasil, segundo os dados mais recentes do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2012 é de 8.900 novos casos. O diagnóstico precoce, a estimativa de risco e de progressão deste tumor possuem um impacto significativo no prognóstico da doença. Embora existam alguns marcadores moleculares para este tumor, a acurácia obtida ainda não é a ideal. Estudos que correlacionam diferentes polimorfismos, metilação do DNA e níveis de expressão gênica para o câncer de bexiga são escassos na literatura e há necessidade de expandir tais estudos na busca de marcadores moleculares mais eficientes, tanto de risco como de progressão para esta doença. No presente trabalho, foram investigados genes que podem ter função relevante na carcinogênese da bexiga. Para isto, foram realizadas análises de variantes alélicas polimórficas através de diferentes técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) em 129 pacientes com carcinoma urotelial de bexiga e 129 indivíduos controle pareados. Os polimorfismos investigados foram: *CYP1A1*(rs1048943; Ile462Val), *MGMT*(rs2308321; Ile143Val e rs2308327; Lys178Arg), *GSTP1*(rs1695; Ile105Val) e as deleções dos genes *GSTMI* e *GSTT1*. Além disso, foi realizada a análise do perfil de metilação da região promotora dos genes *GSTP1* e *MGMT* no DNA genômico de 39 amostras de tecido tumoral de bexiga e 4 amostras de tecido normal. O DNA foi extraído, modificado pelo bissulfito de sódio e a técnica de Curva de *Melting* de Alta Resolução (MS-HRM) foi utilizada. Inicialmente observou-se um desequilíbrio perfeito de ligação entre os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 do gene *MGMT*, sendo que o primeiro possui potencial como tagSNP na população brasileira. Além disso, o genótipo nulo do gene *GSTT1* demonstrou associação com um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga entre fumantes (OR=3,78; IC 95%=1,64-8,70) e entre indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos (OR=3,08; IC 95%=1,23-7,70). O polimorfismo rs1048943 do gene *CYP1A1* também apresentou associação com o câncer de bexiga entre indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos (OR=6,34; IC 95%=1,33-30,33). O genótipo raro do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* apresentou um efeito protetor ao câncer de bexiga entre fumantes (OR=0,15; IC 95%=0,03-0,76). Os polimorfismos do gene *MGMT* e *GSTMI* não apresentaram associação significativa com o câncer de bexiga em nenhuma das análises e nenhum dos polimorfismos apresentou associação com a progressão da doença. Os níveis de metilação do gene *GSTP1* ficaram em torno de 0% para todas as amostras analisadas, não sendo observada diferença significativa entre amostras tumorais e normais. Já para o gene *MGMT* todas as amostras demonstraram um perfil de *melting* diferenciado em relação à curva padrão, indicando a presença de metilação heterogênea, entretanto, sem diferença significativa entre amostras tumorais e normais. Os resultados da análise de metilação carecem de investigações adicionais para quantificar a metilação no gene *MGMT* e verificar seu potencial como biomarcador. A associação do genótipo nulo do gene *GSTT1* com o câncer de bexiga observada no presente estudo demonstra o potencial desta deleção como marcador de suscetibilidade para esta doença.

**Palavras-chave:** Câncer de bexiga. Polimorfismos genéticos. Metilação. Genes do biometabolismo. *MGMT*.

LENGERT, André van Helvoort. **Analysis of methylation of *GSTP1* and *MGMT* genes and polymorphisms of *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP1A1* and *MGMT* genes, as molecular markers of bladder cancer.** 2012. 74 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

Bladder cancer is the second most frequent type of tumor found in the urinary system. In Brazil, according to the latest data from the National Cancer Institute (INCA), the estimate for the year 2012 is 8,900 new cases. Early diagnosis, estimation of risk and progression of this tumor has a significant impact on prognosis of the disease. Although there are some molecular markers for this tumor, the accuracy obtained is not ideal. Studies that correlate polymorphisms, DNA methylation and gene expression levels are rare and there is a need to expand such studies in search of more efficient molecular markers, for risk and progression of this disease. In the present study, we investigated genes that may have relevant role in bladder carcinogenesis. We analyzed 6 polymorphisms using different techniques based on polymerase chain reaction (PCR) in 129 patients with bladder cancer and 129 matched control subjects. The polymorphisms investigated were: *CYP1A1* (rs1048943; Ile462Val), *MGMT* (rs2308321, rs2308327 and Ile143Val; Lys178Arg), *GSTP1* (rs1695; Ile105Val) and deletions of *GSTM1* and *GSTT1*. Furthermore, we performed analysis of methylation profile of *GSTP1* and *MGMT* promoter region genes in genomic DNA samples from 39 bladder tumor tissue and 4 normal tissue samples. DNA was extracted, converted by bisulfite and Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) was used. Initially we observed a perfect linkage disequilibrium between the polymorphisms rs2308321 and rs2308327 from *MGMT* gene and the first had potential as a tagSNP in our population. Furthermore, the *GSTT1* null genotype showed an increased association with susceptibility to bladder cancer among smokers (OR = 3.78, 95% CI = 1.64 to 8.70) and among individuals occupationally exposed to pesticides (OR = 3.08, 95% CI = 1.23 to 7.70). The *CYP1A1* rs1048943 polymorphism was associated with bladder cancer among individuals occupationally exposed to pesticides (OR = 6.34, 95% CI = 1.33 to 30.33). The rare genotype of the rs1695 polymorphism of the *GSTP1* gene had a protective effect among smokers (OR = 0.15, 95% CI = 0.03 to 0.76). The *MGMT* and *GSTM1* gene polymorphisms were not significantly associated with bladder cancer in any of analyzes and none of the polymorphisms showed a correlation with disease progression. The levels of methylation of *GSTP1* gene were approximately 0% for all samples analyzed and no significant difference between tumor and normal samples were observed. For the *MGMT* gene all samples showed a different melting profile compared to the standard curve, indicating the presence of heterogeneous methylation. No significant difference between tumor and normal samples were observed. The results of methylation analysis require further investigation to quantify and verify the potential of *MGMT* methylation as a biomarker. The association of the *GSTT1* null genotype with bladder cancer observed in this study demonstrates the potential of this deletion as a marker of susceptibility to this disease.

**Keywords:** Bladder cancer. Genetic polymorphisms. Methylation. Biometabolism genes. *MGMT*.

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO 1

- Tabela 1** – *Frequências genotípicas e alélicas de dois sítios polimórficos do gene MGMT* .....20
- Tabela 2** – *Comparação entre as frequências genotípicas e estimativas de desequilíbrio de ligação entre dois sítios polimórficos do gene MGMT na população do presente estudo (BRA) e nas diferentes populações descritas no projeto HapMap* .....21

### MANUSCRITO 2

- Tabela 1** – *Descrição dos polimorfismos estudados, seus respectivos genótipos e metodologias para análise*.....33
- Tabela 2** – *Comparação da distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos estudados entre pacientes e controles* .....35
- Tabela 3** – *Comparação entre pacientes e controles da distribuição genotípica dos polimorfismos estudados em relação ao hábito tabagista*.....36
- Tabela 4** – *Comparação entre pacientes e controles da distribuição genotípica dos polimorfismos estudados em relação à exposição ocupacional a agroquímicos* .....37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 MANUSCRITO 1</b> .....	15
<b>4 MANUSCRITO 2</b> .....	28
<b>5 MANUSCRITO 3</b> .....	46
<b>CONCLUSÕES</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>ANEXOS</b> .....	63
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Universitário Regional Norte do Paraná .....	64
ANEXO B – Autorização do Hospital do Câncer de Londrina para a utilização das amostras dos pacientes do Serviço de Urologia.....	65
ANEXO C – Normas da revista <i>American Journal of Human Biology</i> , sob as quais o manuscrito 1 foi redigido .....	66
ANEXO D – Normas da revista <i>Cancer Investigation</i> , sob as quais o manuscrito 2 foi redigido.....	70
ANEXO E – Normas da revista <i>Urologic Oncology – Seminars and Original Investigation</i> , sob as quais o manuscrito 3 foi redigido manuscrito 3 foi redigido.....	73

## 1 INTRODUÇÃO

A bexiga é um órgão alojado na pélvis, que tem a capacidade de se expandir e que possui a função de armazenar a urina produzida pelo corpo. Todo o sistema urinário, incluindo a pelve renal, ureteres e bexiga é revestido internamente por uma camada de células transicionais, chamado urotélio (1).

O câncer de bexiga não está entre as neoplasias mais frequentes, entretanto é o segundo tipo de tumor mais encontrado no sistema urinário. No Brasil, segundo os dados mais recentes do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para o ano de 2012 é de 8.900 novos casos. O número de mortes estimado para o ano de 2008 no Brasil foi de 2.821, sendo 1.967 homens e 854 mulheres (2). O câncer de bexiga é mais comum em homens que em mulheres (proporção 3:1). Além disso, esta doença é mais frequente na etnia caucasiana, e apresenta maior incidência na sexta década de vida (3), sendo a idade média no diagnóstico entre 65 e 70 anos. O risco de desenvolver câncer de bexiga aos 75 anos de idade é de 2 a 4% para homens e 0,5 a 1% para mulheres (4).

Este é o carcinoma que apresenta o custo mais elevado por paciente, desde o momento do diagnóstico até a morte do paciente, independentemente da causa *mortis*. Isto se deve principalmente ao fato de metade dos pacientes com câncer de bexiga apresentarem recorrências em um período de 5 anos (5,6). Os monitoramentos para recorrência ou progressão são realizados por meio de citoscopias periódicas e citologia urinária, sendo que a frequência destes exames depende dos fatores de risco associados com a doença. A citoscopia está associada a um alto custo, desconforto do paciente e sensibilidade variável. Além disso, a citologia urinária possui uma baixa sensibilidade na detecção da doença em baixo grau e a sua acurácia depende da experiência do patologista. Portanto, métodos mais sensíveis e não invasivos são necessários (7).

De uma maneira geral, o câncer de bexiga é uma doença heterogênea, na qual são observados tumores com uma baixa taxa de progressão, que requerem ressecção transuretral e seguimento prolongado, mas que raramente constituem uma ameaça para o paciente, além de tumores com um alto potencial maligno associado com progressão e taxas de morte significativas (8), sendo que, em 16 a 25% das recorrências ocorre uma evolução de baixo para alto grau (7). Em menos de um terço dos casos, o tumor invade mais profundamente a bexiga, comprometendo a camada muscular da mesma. Uma minoria (5%) se apresenta de forma avançada com metástases (1). A frequente recorrência e a subsequente

progressão do tumor após a ressecção são considerados os grandes problemas do câncer de bexiga (7).

Os tumores de bexiga são considerados superficiais (Tis, Ta, T1) ou infiltrativos (T2, T3, T4) baseados na citoscopia, ressecção transuretral, exames de imagem e histopatológicos. Mais de 90% dos casos de câncer de bexiga consistem de tumores derivados de células transitórias. Carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas correspondem a 5% e 2% respectivamente (9). Quando diagnosticados em estágio inicial, a sobrevida por 5 anos chega a 94%. A taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com tumor de bexiga avançados localmente ou com metástases à distância são respectivamente, de 48% e 6% (10).

A prevalência do câncer de bexiga varia entre as etnias e entre as populações dos diferentes países, sendo mais frequente na América do Norte e Rússia. Estas variações são causadas por uma combinação de fatores, como suscetibilidade genética, exposição a fatores de risco ou estilo de vida (4).

Ainda não se sabe exatamente o que causa o câncer de bexiga, porém, alguns fatores de risco foram relacionados nos pacientes com este tumor, dentre os quais destacam-se a idade, hábito tabagista, exposição ocupacional à borracha, tinturas, derivados do petróleo, couro e corantes artificiais, antecedentes familiares, infecção crônica, cálculos e instrumentação das vias urinárias (11,12). Deve-se levar em conta que há maior incidência de câncer de bexiga nas regiões industrializadas, devido à relação com o local de trabalho e exposição a carcinógenos. Trabalhadores de indústrias relacionadas aos fatores de risco citados têm maiores chances de desenvolver esse tumor (13), assim como fumantes têm quatro vezes mais chance de desenvolver câncer de bexiga do que não fumantes (14). Embora o hábito tabagista seja o fator de risco melhor estabelecido, fatores adicionais possuem um papel na modificação deste risco relacionado ao cigarro. Existem algumas populações com altas taxas de hábito tabagista e baixa frequência de câncer de bexiga (ex. nativos do Hawaii e Maoris da Nova Zelândia). Isto indica que devem existir diferenças genéticas individuais no biometabolismo e, possivelmente, no reparo de carcinógenos relacionados ao cigarro (8). Contudo, os mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos no desenvolvimento e na progressão do câncer de bexiga são ainda pouco conhecidos.

Um grande número de estudos tem procurado marcadores, buscando uma associação entre genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos e pelo reparo do DNA e o desenvolvimento de câncer, incluindo o de bexiga (15). Uma das abordagens utilizadas na busca por marcadores é através do estudo de polimorfismos, que são variações na sequência do DNA, como substituições de nucleotídeos, inserções ou deleções, e que

ocorrem na população em uma frequência de, no mínimo, 1%. Estas alterações podem ou não causar alterações na função de proteínas e no fenótipo (16).

Os polimorfismos metabólicos mais associados ao aumento do risco de câncer de bexiga incluem os dos genes das famílias dos citocromos P450 (17), das glutathione S-transferases e das N-acetil-transferases (18,19). As enzimas da superfamília citocromo P450 catalisam a oxidação de um grande número de compostos endógenos e exógenos. Embora a maior parte dos metabólitos resultantes seja eliminada, alguns são eletrofílicos e podem reagir com o DNA. O gene *CYP1A1* participa da ativação de pró-carcinógenos do tabaco, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas (20). Este gene é altamente polimórfico, e uma substituição A→G no códon 462 (rs1048943) leva a uma mudança no aminoácido Ile→Val, o que causa uma alteração na sequência codificada, podendo levar a uma alteração na atividade da enzima e a um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga. Contudo, até o momento não foram observadas evidências desta associação (21).

Glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas de fase II do biometabolismo, que possui um papel chave na detoxificação de substratos exógenos, tais como xenobióticos e compostos carcinogênicos (22). Em seres humanos, 8 classes distintas do gene codificam GSTs solúveis: *alpha*, *mu*, *theta*, *pi*, *zeta*, *sigma*, *kappa* e *chi* (também conhecida como *omega*) (23). Diversas GSTs são polimórficas e as proteínas codificadas pelas diferentes variantes alélicas possuem diferentes capacidades de se ligarem e, possivelmente, de metabolizarem compostos eletrofílicos e produtos do estresse oxidativo (24), influenciando, com isso, a suscetibilidade individual a várias patologias, incluindo o câncer. Dentro da família GST os genes glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*), glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) e glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) foram considerados como tendo algum tipo de associação com câncer de bexiga (25).

A herança de alelos parentais deletados de *GSTM1* e *GSTT1* resulta na perda da atividade enzimática, levando a uma menor capacidade de detoxificar xenobióticos e redução na defesa contra estresse oxidativo e danos celulares mediados por radicais livres. Apesar de existirem muitos resultados conflitantes na literatura ao longo das últimas décadas, existem evidências de que os genótipos nulo de *GSTM1* e *GSTT1* contribuem com um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga (25,26).

O gene *GSTP1* possui diversos polimorfismos já descritos, entre eles, uma substituição A→G no nucleotídeo 313, códon 105 (rs1695), que resulta em uma mudança de aminoácido Ile→Val no sítio de ligação da enzima GSTP1 ao substrato, modificando sua atividade catalítica (27). A relação deste polimorfismo com o câncer de bexiga é também

bastante controversa na literatura, com estudos relatando aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga (28,29) e ausência de associação significativa (30-33).

Os polimorfismos de genes de reparo mais associados ao aumento do risco de câncer de bexiga são os dos genes *XPD* (*Xeroderma Pigmentosum, complementation group D*), *XRCC1* (*X-ray Cross Complementing Group 1*) e *XRCC3* (*X-ray Cross Complementing Group 3*) (34-36). No entanto, acredita-se que polimorfismos no gene de reparo *MGMT*, possam apresentar um papel no surgimento de tumores que possuam relação com o hábito tabagista (37), como é o caso do câncer de bexiga.

A enzima de reparo do DNA *MGMT* atua sobre adutos  $O^6$ -alquilguanina que são induzidos no DNA por uma série de agentes alquilantes exógenos e endógenos (38). Adutos de DNA induzidos pela nitrosamina derivada da nicotina (NNK) são substratos para a *MGMT*, e um reparo deficiente de tais adutos pode desempenhar um papel na indução tumoral, já observado em roedores (39).

Diferentes polimorfismos já foram descritos no gene *MGMT* (40-42), sendo que grande parte dos estudos concentra-se nos polimorfismos rs2308321 (A→G; Ile143Val) e rs2308327 (A→G; Lys178Arg), que levam a alterações na sequência codificante e são detectados em indivíduos com câncer (43). Ambos os polimorfismos estão localizados muito próximos ao sítio de atividade Cys145 da enzima, o que evidencia a importância de seu estudo (41).

Normalmente os estudos das frequências dos alelos de genes do biometabolismo e de reparo envolvem o uso de controles pareados em relação ao sexo, etnia e idade. Vários estudos têm descrito as frequências dos alelos de genes do biometabolismo em populações-controle de distintas regiões brasileiras (44-46), incluindo o Paraná (47,48). Esses dados são muito importantes, pois segundo Conforti-Froes e colaboradores (49), o melhor entendimento da associação entre câncer, biomarcadores de suscetibilidade e exposições ambientais em determinada região geográfica depende da distribuição na população de genes metabolizadores de xenobióticos.

Outra abordagem que vem ganhando cada vez mais destaque é o estudo dos padrões de metilação de regiões promotoras de genes. As alterações observadas no padrão de metilação do DNA são um evento inicial e contínuo no câncer, ao longo de toda sua evolução. Além disso, tipos distintos de tumores geralmente possuem padrões característicos de metilação e isto pode ser utilizado como marcador na detecção precoce e/ou monitoramento da progressão da carcinogênese (50,51).

Nenhum dos marcadores estudados e testados até o momento, tanto genéticos quanto epigenéticos, demonstraram sensibilidade e especificidade suficientes para detectar as diferentes formas do câncer de bexiga na rotina da prática clínica. Isto torna o estudo e desenvolvimento de novos marcadores extremamente importante na medida em que estes marcadores indiquem parâmetros que possam ser interessantes para auxiliar no diagnóstico ou prever o prognóstico, especialmente no grupo de pacientes com risco de recorrência e progressão do tumor para formas mais agressivas (7).

Nosso grupo tem consolidado uma linha de pesquisa que envolve o estudo de diversas variantes genéticas herdadas em genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos e no reparo a danos no DNA em carcinomas do trato genitourinário (52-54). No presente estudo propomos a ampliação desta linha de pesquisa acima citada, pela investigação de genes com função provável na carcinogênese da bexiga urinária. Para isto serão analisadas as presenças de variantes alélicas polimórficas nos genes do metabolismo de xenobióticos, *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP1A1* e de reparo a danos no DNA, *MGMT*, bem como o perfil de metilação e os níveis de expressão dos genes *MGMT* e *GSTP1* em amostras de tecido tumoral e normal da bexiga urinária.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar novos marcadores moleculares de risco e prognóstico associados ao carcinoma de bexiga urinária.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo do tipo caso-controle para verificar se as variantes polimórficas dos genes *GSTP1*, *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP1A1* e *MGMT* possuem associação com a suscetibilidade ao câncer de bexiga;
- Correlacionar os dados do estudo de associação com parâmetros clínicos e histopatológicos para avaliar o potencial da presença das variantes como marcadores moleculares de progressão tumoral;
- Estimar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre dois polimorfismos do gene *MGMT* na população estudada;
- Avaliar no DNA obtido de amostras de carcinomas de bexiga com diferentes graus histológicos os padrões de metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT* para verificar o potencial prognóstico destes padrões como marcadores moleculares de uso clínico;

**3 MANUSCRITO 1**

**DESEQUILÍBRIO PERFEITO DE LIGAÇÃO ENTRE DOIS POLIMORFISMOS DO  
GENE *MGMT* EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

**André Van Hevoort Lengert, Marilesia Ferreira De Souza, Hellen Kuasne E Ilce Mara  
De Syllos Cólus**

- Artigo a ser submetido à revista: *American Journal of Human Biology*

ISSN: 1520-6300

Fator de impacto: 2,021

## DESEQUILÍBRIO PERFEITO DE LIGAÇÃO ENTRE DOIS POLIMORFISMOS DO GENE *MGMT* EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

André Van Hevoort Lengert<sup>1</sup>, Marilesia Ferreira De Souza<sup>1</sup>, Hellen Kuasne<sup>1</sup> E Ilce Mara De Syllos Cólus<sup>1</sup>

### Resumo

**Objetivos:** Avaliar, em uma população brasileira, as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs2308321 (Ile143Val) e rs2308327 (Lys178Arg) do gene *MGMT* e verificar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre eles, conforme observado em outras populações.

**Métodos:** Os dois polimorfismos foram analisados pela reação em cadeia da polimerase em tempo real em 252 indivíduos e foram avaliados o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, frequências alélicas e genotípicas e desequilíbrio de ligação.

**Resultados:** Os alelos raros dos dois polimorfismos tiveram frequência igual a 11,1% e as distribuições genotípicas estavam de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Os dois polimorfismos apresentaram perfeito desequilíbrio de ligação ( $D' = 1,00$ ;  $r^2 = 1,00$ ).

**Conclusões:** O polimorfismo rs2308321 pode ser considerado um marcador útil para estudos de associação, e apresenta potencial como tagSNP na população brasileira.

**Palavras-chave:** *MGMT*. Desequilíbrio de ligação. Polimorfismos genéticos. TagSNPs

### INTRODUÇÃO

A estabilidade e a integridade do genoma são mantidas por genes de reparo do DNA e alterações genéticas nestes genes, como mutações raras e polimorfismos, podem levar a diferenças individuais na capacidade de reparar o DNA (Zhong et al., 2010). Polimorfismos de base única (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*) podem gerar pequenas alterações estruturais em enzimas de reparo, o que pode levar a mudanças na suscetibilidade individual ao câncer (Huang et al., 2007). Mais de 150 genes de reparo humano já foram descritos (Wood et al., 2005) e diversos SNPs nestes genes foram identificados (Ford et al., 2000). A O<sup>6</sup>-metil-guanina-DNA metiltransferase (*MGMT*; EC 2.1.1.63, também encontrada como AGT, AGAT e ATase) é conhecida como sendo uma das mais importantes proteínas de reparo por ação direta no DNA, pois possui grande atividade sobre a O<sup>6</sup>metilguanina (O<sup>6</sup>-MeG), além de reparar uma grande variedade de outras lesões O<sup>6</sup>-alquila, incluindo adutos etil, cloroetil, piridiloxobutil, butil e benzil (Bronstein et al., 1992; Ellison et al., 1989; Mijal et al., 2004; Pegg e Byers 1992; Wang et al., 1996). A *MGMT* atua

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

em uma reação de passo único, removendo um grupo alquil para um resíduo de cisteína no sítio ativo da sua molécula, por transferência covalente irreversível. Esta reação minimiza os efeitos mutagênicos de agentes alquilantes exógenos e endógenos sobre o DNA, porque os adutos formados por tais agentes podem levar a um acúmulo de mutações no DNA genômico (transições de G:C para A:T), o que pode, eventualmente, levar ao desenvolvimento de câncer (Li et al., 2005; Pegg e Byers 1992).

O gene *MGMT* está localizado no cromossomo 10q26.3 (Natarajan et al., 1992), possui cinco éxons e mais de 300 kb e é responsável pela codificação da proteína MGMT, que possui um peso molecular aproximado de 24 kDa e é formada por 207 aminoácidos (Zhong et al., 2010). Diferentes polimorfismos já foram descritos no gene *MGMT* (Abe et al., 1997; Egyházi et al., 2002; Ford et al., 2000), sendo que grande parte dos estudos concentra-se nos polimorfismos rs2308321 (A:G; Ile143Val) e rs2308327 (A:G; Lys178Arg), que levam a alterações na sequência codificante do gene (Pegg et al., 2007).

Diversos estudos de associação foram realizados na tentativa de estabelecer alguma relação entre os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 com doenças complexas, principalmente com o surgimento e desenvolvimento de tumores. Em uma meta-análise realizada por Zhong e colaboradores (2010), não foi observada associação do polimorfismo rs2308321 com a suscetibilidade a diferentes tipos de câncer entre caucasianos e asiáticos. Além disso, nenhuma associação foi observada com tumores de mama (Shen et al., 2005), pâncreas (Li et al., 2006), próstata (Ritchev et al., 2005) ou pulmão (Yang et al., 2004). Mesmo com o grande número de estudos epidemiológicos existentes na literatura, não é possível obter informações claras da influência das variantes polimórficas do gene *MGMT* na suscetibilidade ao câncer e a outras doenças (Pegg et al., 2007).

Alguns estudos relatam a existência de um forte desequilíbrio de ligação (DL), que é definido como uma medida estatística da não-independência de alelos em *loci* adjacentes (Ching-Yu et al., 2008), entre os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 em diferentes populações (Cohet et al., 2004; Huang et al., 2007; Kaur et al., 2000; Yang et al., 2004). Este tipo de relato é de grande importância, pois a melhor compreensão da estrutura do DL no genoma humano pode permitir a seleção de tagSNPs, que são aqueles SNPs que possuem um alto desequilíbrio de ligação com outros SNPs dentro de um mesmo bloco haplotípico. Em geral os tagSNPs têm grande importância, pois a presença do alelo raro no tagSNP pode prever, de maneira eficiente, a presença da variante rara em outros SNPs em uma determinada região genômica, maximizando o poder de estudos com SNPs e minimizando a perda de informação (Daly et al., 2001; Johnson et al., 2001).

Nesse contexto, foi idealizado o Projeto Internacional *HapMap* no ano de 2002 para criar um banco de dados público de variações comuns de sequências do genoma humano, fornecendo informações necessárias para guiar o *design* e a análise de estudos genéticos. Um dos resultados relevantes deste Projeto foi a publicação dos padrões de DL envolvendo inúmeros SNPs (The International HapMap Consortium, 2003). O estabelecimento dos padrões de DL presentes nas populações humanas tem sido considerado desde então, de grande importância para reduzir o número de SNPs utilizados em estudos de associação, diminuindo, assim, o custo de tais estudos e dando origem a uma nova era na genética de populações, fornecendo uma oportunidade sem precedentes para a investigação das forças evolutivas que direcionaram as variações nas populações naturais (González-Neira et al., 2006; Johnson et al., 2001; Montpetit et al., 2006; The International HapMap Consortium, 2005).

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar, em uma amostra da população brasileira, as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs2308321 (Ile143Val) e rs2308327 (Lys178Arg) do gene *MGMT*, verificar a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre eles, conforme observado em populações da Europa, Ásia, África e América do Norte, contribuindo para a caracterização de tagSNPs na população brasileira.

## **MÉTODOS**

### *Amostra*

Foram avaliados 252 indivíduos brasileiros, originários predominantemente das regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo 92,3% classificados como brancos ou pardos e 7,7% como negros, seguindo as categorias étnico-raciais consideradas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008). O DNA genômico de cada indivíduo foi obtido a partir de 5mL de sangue periférico através da ação enzimática da proteinase K (10mg/mL) e posterior purificação com solventes orgânicos (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - Life Technologies), conforme instruções do fabricante. O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e as amostras foram coletadas apenas após cada participante assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### *Genotipagem*

Os dois polimorfismos do gene *MGMT* (rs2308321 e rs2308327) foram analisados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, utilizando a metodologia *TaqMan* (Life Technologies). As PCRs foram realizadas no equipamento Quantica Real-Time (Techne) e consistiram em um passo inicial de 10 minutos a 95°C para ativação da enzima AmpliTaq Gold, seguido por 50 ciclos de dois passos, sendo o primeiro uma desnaturação a 92°C por 15 segundos e o segundo o anelamento e extensão dos *primers* a 60°C por 90 segundos. Foi utilizado em cada reação 5 µl de *TaqMan Genotyping Master Mix* (2X), 0,5 µl de *TaqMan Genotyping Assay Mix* (20X) e 5 ng de DNA. Foi utilizado um DNA controle com o genótipo do gene *MGMT* conhecido para verificar a confiabilidade dos resultados obtidos. Duplicatas para controle de qualidade foram incluídas aleatoriamente nas reações de genotipagem, sendo que nenhum dos genótipos apresentou discordância.

### *Análise estatística*

As frequências dos polimorfismos foram determinadas através da contagem direta dos genótipos e alelos. Desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e comparação de nossos resultados com outras populações previamente estudadas foram realizados através do teste de Qui-quadrado. O desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* foi avaliado utilizando-se os dados genotípicos. Foram considerados os valores absolutos de desequilíbrio de ligação normalizados  $D'$  e a correlação de alelos ( $r^2$ ) entre os dois sítios, que são as medidas mais comuns e complementares para desequilíbrio de ligação (Hartl e Clark, 2006). As análises foram realizadas utilizando-se o *software Arlequin 3.1* (Excoffier et al., 2005).

## **RESULTADOS**

### *Frequências genotípicas e alélicas*

As frequências genotípicas e alélicas dos dois polimorfismos do gene *MGMT* analisados em 252 indivíduos estão apresentadas na Tabela 1 e encontram-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

**Tabela 1** – Frequências genotípicas e alélicas de dois sítios polimórficos do gene *MGMT*

Sítio Polimórfico	Alelo	Frequência	Genótipo	Frequência
rs2308321	A	88,9	A/A	78,2
	G	11,1	A/G	21,4
			G/G	0,4
rs2308327	A	88,9	A/A	78,2
	G	11,1	A/G	21,4
			G/G	0,4

### *Desequilíbrio de ligação*

Para estimar o desequilíbrio de ligação, foram calculados os valores de  $D'$  e  $r^2$  utilizando-se os dados de frequências genotípicas. Os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 estavam em completo desequilíbrio de ligação ( $D' = 1,00$ ;  $r^2 = 1,00$ ), e os valores encontrados foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

## **DISCUSSÃO**

### *Frequências genotípicas e alélicas*

Inicialmente foram comparadas as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs2308321 e rs2308327 entre a população brasileira analisada (BRA), e os dados das populações registradas no Projeto Internacional *HapMap* (The International HapMap Consortium, 2005). As 11 populações incluídas foram: indivíduos de Utah, EUA, com ancestrais do norte e oeste da Europa (CEU); chineses Han de Pequim, China (CHB); japoneses de Tóquio, Japão (JPT); Iorubás de Ibadan, Nigéria (YRI); descendentes de africanos do sudoeste dos EUA (ASW); chineses da região metropolitana de Denver, Colorado, EUA (CHD); indianos Gujarati de Houston, Texas, EUA (GIH); Luhyas de Webuye, Quênia (LWK); Masais de Kinyawa, Quênia (MKK); descendentes de mexicanos de Los Angeles, Califórnia, EUA (MXL); indivíduos da Toscana na Itália (TSI) (Tabela 2).

Observando-se as frequências genotípicas dos dois polimorfismos do gene *MGMT* na Tabela 2, podemos afirmar que a população do presente estudo apresentou uma grande similaridade na distribuição genotípica dos polimorfismos com as populações CEU e TSI e que juntas, essas três populações demonstram certa diversidade das demais.

**Tabela 2** – Comparação entre as frequências genótípicas e estimativas de desequilíbrio de ligação entre dois sítios polimórficos do gene *MGMT* na população do presente estudo (BRA) e nas diferentes populações descritas no projeto HapMap

População	Genótipos (%)						Desequilíbrio de Ligação	
	rs2308321			rs2308327			$D'$	$r^2$
	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G		
BRA	78,2	21,4	0,4	78,2	21,4	0,4	1,00	1,00
CEU	69	30,1	0,9	70,3	28,8	0,9	1,00	0,966
CHB	99,3	0,7	0	99,3	0,7	0	1,00	1,00
JPT	100	0	0	100	0	0	1,00	1,00
YRI	100	0	0	100	0	0	1,00	1,00
ASW	94,7	5,3	0	94,7	5,3	0	1,00	1,00
CHD	98,2	1,8	0	98,2	1,8	0	1,00	1,00
GIH	90,1	8,9	1	90,1	8,9	1	1,00	1,00
LWK	99,1	0,9	0	99,1	0,9	0	1,00	1,00
MKK	99,4	0,6	0	99,4	0,6	0	1,00	1,00
MXL	94,8	5,2	0	94,8	5,2	0	1,00	1,00
TSI	78,4	21,6	0	78,4	21,6	0	1,00	1,00

A partir destes dados foi elaborada a hipótese de que as mutações A:G no códon 143 e A:G no códon 178 surgiram ao mesmo tempo e em uma população ancestral europeia. Isto fica claro quando observamos que as maiores frequências dos alelos raros destes polimorfismos são encontradas nas populações CEU e TSI, que são de origem europeia, e na população BRA (Brasil). Nas populações YRI (Nigéria) e JPT (Japão) os alelos raros não são observados, e nas demais os alelos raros são encontrados em frequência baixa. Tais observações vão de acordo com a hipótese elaborada. Contudo, para corroborar tal hipótese, é importante a realização de experimentos adicionais que busquem as frequências de tais alelos em outras populações, especialmente naquelas compostas por indivíduos originários de diferentes partes do continente europeu, além de populações brasileiras nativas. Esta análise poderia auxiliar na compreensão da origem dos alelos em questão, e das respectivas frequências observadas no presente estudo, indicando a importância destes alelos para estudos posteriores de evolução humana. A população brasileira é altamente miscigenada e varia muito de acordo com a região do país à qual pertencem os indivíduos que estão sendo analisados, contudo, de uma maneira geral, a maior contribuição em sua composição é europeia (Callegari-Jacques et al., 2003). As amostras do presente estudo são provenientes

majoritariamente da região sul do país, que possui um histórico de imigração européia, o que torna seu *background* genético bastante semelhante ao observado entre os indivíduos europeus. Entretanto, é possível observar em nossos resultados uma redução na frequência dos alelos raros na população BRA em relação à população CEU, o que pode ser explicado pelo contato com o *pool* de alelos africanos e ameríndios.

### *Desequilíbrio de ligação*

O desequilíbrio de ligação é muito útil para guiar a seleção de tagSNPs e detectar associação entre marcadores e variantes funcionais que constituem a base da suscetibilidade a diferentes doenças (Ardlie et al., 2002; Bakker et al., 2005).

Nossos resultados demonstram que os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 se encontram em perfeito desequilíbrio de ligação na população analisada. É possível perceber que este é um resultado consistente entre populações, quando comparamos os dados do presente estudo com as diferentes populações do Projeto *HapMap*, as quais apresentam este mesmo desequilíbrio. Na literatura observam-se alguns estudos que, apesar de não encontrarem um perfeito desequilíbrio de ligação entre estes polimorfismos, ainda o observam em um nível elevado (Huang et al., 2007; Yang et al., 2004).

Dentro da sequência do gene *MGMT* foram descritos 509 SNPs e, entre estes, 321 possuem a frequência do alelo raro maior do que 5%, indicando sua alta frequência na população. De acordo com o projeto *HapMap* e com os estudos de associação amplos do genoma (GWAS, *genome wide association studies*) gerados a partir de dados do banco *HapMap*, existem 57 tagSNPs no gene *MGMT*, estando entre eles o rs2308321. Tais tagSNPs estão em alto desequilíbrio de ligação com outras variantes e são suficientes para representar todos os alelos comuns com  $r^2 > 0,8$  (Bugni et al., 2007).

Os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 localizam-se em um bloco haplotípico caracterizado por um alto desequilíbrio de ligação e baixa diversidade haplotípica. Segundo dados do Projeto *HapMap* obtidos pelo *software Haploview* (Barret et al., 2005), o polimorfismo rs2308321 está em desequilíbrio perfeito com outros 19 polimorfismos. Estes dados sugerem que este polimorfismo pode ser utilizado como um tagSNP para seu bloco haplotípico. Dados do Projeto *Ensembl* (Flicek et al., 2011), indicam que este polimorfismo é considerado um tagSNP em duas populações distintas (CEU e LWK).

Foi proposto que as populações utilizadas no Projeto *HapMap* sejam consideradas referências para a seleção de tagSNPs em outras populações do mundo.

Entretanto, ainda não se sabe se as informações extraídas deste projeto poderão ser aplicadas em diferentes populações (González-Neira et al., 2006; The International HapMap Consortium, 2005). Além disso, não está claro se o tamanho amostral utilizado para criar o Projeto *HapMap* é grande o suficiente para transmitir toda a informação que ele disponibiliza (Montpetit et al., 2006).

Tantoso e colaboradores (2006) demonstraram que os SNPs descritos no projeto *HapMap* podem ser utilizados em outras populações de mesma origem étnica e continental. Contudo, quando se leva em consideração populações que apresentam um elevado grau de miscigenação, como a brasileira, a transferência dos dados de tagSNPs e de desequilíbrio de ligação pode ser influenciada por fatores genéticos ou por eventos demográficos. Lins e colaboradores (2009) sugeriram que, devido a estes fatores, a seleção de um marcador mais eficiente para populações miscigenadas pode ser realizada através de um *pool* de diferentes populações do projeto *HapMap*. Com isso, para realizar a seleção de tagSNPs para o estudo de genes como o *MGMT* em uma população brasileira, pode-se utilizar as informações do projeto *HapMap* associadas com estudos de desequilíbrio de ligação realizados na própria população, com o objetivo de validar os dados do projeto.

Assim, os dados do presente estudo permitem considerar o polimorfismo rs2308321 como um potencial tagSNP de seu bloco haplotípico na população brasileira. Com isso, torna-se evidente a grande importância existente na determinação das frequências de cada polimorfismo, especialmente em genes relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças, e o desequilíbrio de ligação destes polimorfismos em diferentes populações, e em particular aquelas que ainda não estão incluídas no projeto *HapMap*, como a brasileira.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo reforçam os dados da literatura, que incluem os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 do gene *MGMT* no mesmo bloco haplotípico e consideram o sítio Ile143Val (rs2308321) um marcador útil para estudos de associação, demonstrando na população brasileira, assim como já descrito em outras populações do mundo, potencial como tagSNP.

Considerando o grande número de polimorfismos existentes no gene *MGMT* e o potencial de tais polimorfismos no controle da atividade e regulação gênica, uma avaliação abrangente na variação genética do gene *MGMT* e a identificação de tagSNPs que sejam capazes de marcar regiões neste gene, é de fundamental importância para estudos futuros de associação e evolução humana.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelas bolsas concedidas a Lengert AH, Souza MF e Kuasne H; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa produtividade para Colus IMS; aos médicos urologistas do Hospital do Câncer de Londrina e Hospital Universitário da UEL; Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema; Irmandade Santa Casa de Londrina; à Dra. Regina Célia Poli-Frederico (Universidade Norte do Paraná) pelas amostras cedidas de pacientes e controles; à Ms. Luana Alves Rodrigues e ao Dr. Rogério Fernandes de Souza pelas discussões estatísticas e ao Dr. Paulo Mauricio Ruas pela leitura do manuscrito.

## LITERATURA CITADA

- Abe M, Inoue R, Suzuki T. 1997. A Convenient Method for Genotyping of Human O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase Polymorphism. *Jpn J Human Genet* 42:425-428.
- Ardlie KG, Hruglyak L, Seielstad M. 2002. Patterns of Linkage Disequilibrium in the Human Genome. *Nature Reviews - Genetics* 3:299-309.
- Bakker PIW, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. 2005. Efficiency and power in genetic association studies. *Nature Genetics* 37(11):1217-1223.
- Barret JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2):263-265.
- Bronstein SM, Skopek TR, Swenberg JA. 1992. Efficient Repair of O<sup>6</sup>-Ethylguanine, but not O<sup>4</sup>-Ethylthymine or O<sup>2</sup>-Ethylthymine, Is Dependent upon O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA alkyltransferase and Nucleotide Excision Repair Activities in Human Cells. *Cancer Research* 52:2008-2011.
- Bugni JM, Han J, Tsai M, Hunter DJ, Samson LD. 2007. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Repair* 6:1116–1126.
- Callegari-Jacques SM, Grattapaglia D, Salzano FM, Salamoni SP, Crossetti SG, Ferreira ME, Hutz MH. 2003. Historical Genetics: Spatiotemporal Analysis of the Formation of the Brazilian Population. *American Journal of Human Biology* 15:824-834.
- Ching-Yu Y, Shyun-Yeu L, Chung-Ho C, Hung-Fu T, Li-Yeh C, Cheng-Hong Y, Ying-Chu L, Cheng-Hao W, Wei-Fan C, Chang-Hsuan H, Hsiang-Chi C, Shaio-Ting W, Cheng-Wen L, Hsueh-Wei C. 2008. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, and *XRCC4* and their association with oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 37:271-277.
- Cohet C, Borel S, Nyberg F, Mukeria A, Bruske-Hohlfeld I, Constantinescu V, Benhamou S, Brennan P, Hall J, Boffetta P. 2004. Exon 5 Polymorphisms in the O<sup>6</sup>-Alkylguanine DNA Alkyltransferase Gene and Lung Cancer Risk in Non-Smokers Exposed to Second-Hand Smoke. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:320-323.
- Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. 2001. High resolution haplotype structure in the human genome. *Nature Genetics* 29:229-232.
- Egyházi S, Ma S, Smoczynski K, Hansson J, Platz A, Ringborg U. 2002. Novel O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase SNPs: A Frequency Comparison of Patients With Familial Melanoma and Healthy Individuals in Sweden. *Human Mutation* 549:1-7.
- Ellison KS, Dogliotti E, Connors TD, Basu AK, Essigmann JM. 1989. Site-specific mutagenesis by O<sup>6</sup>-alkylguanines located in the chromosomes of mammalian cells: Influence of the mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8620-8624.
- Excoffier LG, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinformat Online* 1:47-50.

- Flicek P, Amode MR, Barrrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, Larsson P, Longden I, McLaren W, Overduin B, Pritchard B, Riat HS, Rios D, Ritchie GRS, Ruffier M, Schuster M, Sobral D, Spudich G, Tang YA, Trevanion S, Vandrovcova J, Vilella AJ, White S, Wilder SP, Zadissa A, Zamora J, Aken BL, Birney E, Cunningham F, Dunham I, Durbin R, Fernández-Suarez XM, Herrero J, Hubbard TJP, Parker A, Proctor G, Vogel J, Searle SMJ. 2011. Ensembl 2011. *Nucleic Acids Research* 39:800-806.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. 2000. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* 21(11):1977-1981.
- González-Neira A, Ke X, Lao O, Calafell F, Navarro A, Comas D, Cann H, Bumpstead S, Ghorri J, Hunt S, Deloukas P, Dunham I, Cardon LR, Bertranpetit J. 2006. The portability of tagSNPs across populations: A worldwide survey. *GenomeResearch* 16:323–330.
- Hartl, DL, Clark AG. 2006. *Principles of Population Genetics*. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 545 p.
- Huang J, Ye F, Chen H, Lu W, Xie X. 2007. Amino acid substitution polymorphisms of the DNA repair gene *MGMT* and the susceptibility to cervical carcinoma. *Carcinogenesis* 28(6):1314-1322.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Notas técnicas: Características Étnico-Raciais da População - um estudo das categorias de classificação de cor ou raça, 2008. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/caracteristicas\\_raciais/notas\\_tecnicas.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/caracteristicas_raciais/notas_tecnicas.pdf). Acesso em: dez, 2011.
- Johnson GCL, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Genova GD, Ueda H, Cordell HJ, Eaves IA, Dudbridge F, Twells RCJ, Payne F, Hughes W, Nutland S, Stevens H, Carr P, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gough SCL, Clayton DG, Todd JA. 2001. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nature Genetics*. 29:233-237.
- Kaur TB, Travaline JM, Gaughan JP, Richie JP, Stellman SD, Lazarus P. 2000. Role of Polymorphisms in Codons 143 and 160 of the *O*<sup>6</sup>-Alkylguanine DNA Alkyltransferase Gene in Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:339-342.
- Li C, Liu J, Li A, Qian L, Wang X, Wei Q, Zhou J, Zhang Z. 2005. Exon 3 polymorphisms and haplotypes of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and risk of bladder cancer in southern China: A case-control analysis. *Cancer Letters* 227:49-57.
- Li J, Bondy ML, Hassan MM, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. 2006. Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 30(3): 284-291.
- Lins TC, Abreu BS, Pereira RW. 2009. TagSNP transferability and relative loss of variability prediction from HapMap to an admixed population. *Journal of Biomedical Science* 16:73-80.
- Mijal RS, Thomson NM, Fleischer NL, Pauly GT, Moschel RC, Kanugula S, Fang Q, Pegg AE, Peterson LA. 2004. The Repair of the Tobacco Specific Nitrosamine Derived Adduct

- O*<sup>6</sup>-[4-Oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by *O*<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Variants. *Chem Res Toxicol* 17:424-434.
- Montpetit A, Nelis M, Laflamme P, Magi R, Ke X, Remm M, Cardon L, Hudson TJ, Metspalu A. 2006. An Evaluation of the Performance of Tag SNPs Derived from HapMap in a Caucasian Population. *PLoS Genetics* 2(3):282-290.
- Natarajan AT, Vermeulen S, Darroudi F, Valentine MB, Brent TP, Mitra S, Tano K. 1992. Chromosomal localization of human *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by *in situ* hybridization. *Mutagenesis* 7(1):83-85.
- Pegg AE, Byers TL. 1992. Repair of DNA containing *O*<sup>6</sup>-alkylguanine. *The FASEB Journal* 6:2302-2310.
- Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA. 2007. Human variants of *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA repair* 6:1071-1078.
- Ritchey JD, Huang WY, Chokkalingam AP, Gao YT, Deng J, Levine P, Stanczyk FZ, Hsing AW. 2005. Genetic Variants of DNA Repair Genes and Prostate Cancer: A Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1703-1709.
- Shen J, Terry MB, Gammon MD, Gaudet MM, Teitelbaum SL, Eng SM, Sagiv SK, Neugut AI, Santella RM. 2005. *MGMT* genotype modulates the associations between cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 26(12):2131-2137.
- Tantoso E, Yang Y, Li KB. 2006. How well do HapMap SNPs capture the untyped SNPs? *BMC Genomics* 7:238-245.
- The International HapMap Consortium. 2003. The International HapMap Project. *Nature* 426:789-796.
- The International HapMap Consortium. 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299-1320.
- Wang G, Weiss C, Sheng P, Bresnick E. 1996. Retrovirus-Mediated Transfer of the Human *O*<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase Gene into a Murine Hematopoietic Stem Cell Line and Resistance to the Toxic Effects of Certain Alkylating Agents. *Biochemical Pharmacology* 51:1221-1228.
- Wood RD, Mitchell M, Lindahl T. 2005. Human DNA repair genes, 2005. *Mutation Research* 577:275-283.
- Yang M, Coles BF, Caporaso NE, Choi Y, Lang NP, Kadlubar FF. 2004. Lack of association between Caucasian lung cancer risk and *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase-codon 178 genetic polymorphism. *Lung Cancer* 44:281-286.
- Zhong Y, Huang Y, Huang Y, Zhang T, Ma C, Zhang S, Fan W, Chen H, Qian J, Lu D. 2010. Effects of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) polymorphisms on cancer: a meta-analysis. *Mutagenesis* 25(1):83-95.

**4 MANUSCRITO 2**

**POLIMORFISMOS DOS GENES *MGMT*, *CYP1A1*, *GSTP1*, *GSTM1* E *GSTT1* E  
SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER DE BEXIGA EM UMA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA**

**André van Helvoort Lengert, Marilesia Ferreira de Souza, Hellen Kuasne, Dimitrius  
Tansini Pramio, Marco Aurélio Freitas Rodrigues, Paulo Emílio Fuganti, Ilce Mara de  
Syllos Cólus.**

- Artigo a ser submetido à revista: *Cancer Investigation*

ISSN: 0735-7907 (impresso)

Fator de impacto: 2,390

**POLIMORFISMOS DOS GENES *MGMT*, *CYP1A1*, *GSTP1*, *GSTM1* E *GSTT1* E  
SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER DE BEXIGA EM UMA POPULAÇÃO  
BRASILEIRA**

**André van Helvoort Lengert,<sup>1</sup> Marilesia Ferreira de Souza,<sup>1</sup> Hellen Kuasne,<sup>1</sup> Dimitrius  
Tansini Pramio,<sup>1</sup> Marco Aurélio Freitas Rodrigues,<sup>2</sup> Paulo Emílio Fuganti,<sup>3</sup> Ilce Mara de  
Syllos Cólus.<sup>1</sup>**

**Resumo**

A suscetibilidade individual ao câncer de bexiga pode ser modificada pela interação entre fatores genéticos, como diferenças genéticas individuais na resposta a xenobióticos, e carcinógenos químicos ambientais, sendo o hábito tabagista e a exposição ocupacional a certos carcinógenos os principais fatores de risco descritos. O objetivo do presente estudo foi investigar as associações dos polimorfismos dos genes *CYP1A1*(rs1048943; Ile462Val), *MGMT* (rs2308321; Ile143Val e rs2308327; Lys178Arg), *GSTP1*(rs1695; Ile105Val) e das deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com a suscetibilidade e progressão de tumores uroteliais de bexiga. A distribuição destes polimorfismos foi investigada em um estudo do tipo caso-controle, que contou com 129 pacientes com carcinoma urotelial de bexiga e 129 indivíduos controles pareados por idade, gênero, grupo étnico e hábito tabagista. As análises dos polimorfismos foram realizadas por técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados obtidos demonstram que o genótipo nulo do gene *GSTT1* está associado com um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga entre fumantes (OR=3,78; IC 95%=1,64-8,70), entre indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos (OR=3,08; IC 95%=1,23-7,70) e entre os pertencentes a ambos os grupos (OR=5,53; IC 95%=1,59-19,27). O polimorfismo rs1048943 do gene *CYP1A1* apresentou associação com o câncer de bexiga somente entre indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos (OR=6,34; IC 95%=1,33-30,33). O genótipo raro do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* apresentou um efeito protetor ao câncer de bexiga entre fumantes (OR=0,15; IC 95%=0,03-0,76). Os polimorfismos do gene *MGMT* e *GSTM1* não apresentaram associação significativa com o câncer de bexiga em nenhuma das análises e nenhum dos polimorfismos apresentou associação com a progressão da doença. A associação do genótipo nulo do gene *GSTT1* com o câncer de bexiga observada no presente estudo demonstra o potencial desta deleção como marcador de suscetibilidade para esta doença.

**INTRODUÇÃO**

O câncer de bexiga é um problema de saúde global. Estima-se que 386.300 novos casos e 150.200 óbitos decorrentes dessa neoplasia ocorreram em 2008 em todo o mundo, sendo o 9º câncer de maior incidência (1). No Brasil, segundo os dados mais recentes

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral

<sup>2</sup> Departamento de Cirurgia

<sup>3</sup> Hospital do Câncer de Londrina,<sup>3</sup> Londrina, Paraná, Brasil.

do Instituto Nacional de Câncer (2), a estimativa para o ano de 2012 é de 8.900 novos casos. Além disso, esta doença é mais frequente na etnia caucasiana, mais comum em homens que em mulheres (proporção 3:1), e apresenta maior incidência na sexta década de vida (3).

A suscetibilidade ao câncer de bexiga é considerada dependente da interação entre fatores genéticos e carcinógenos químicos ambientais, sendo o hábito tabagista e a exposição ocupacional a certos carcinógenos os principais fatores de risco (4-6).

Carcinomas uroteliais representam mais de 90% dos tumores de bexiga (7) e foi proposto que tais tumores sejam classificados histologicamente como carcinoma urotelial papilífero de baixo grau (bem diferenciado) ou de alto grau (moderadamente e pouco diferenciado) (8). Os tumores de alto grau histológico apresentam pior prognóstico quando comparados aos de baixo grau, com maior possibilidade de recidiva e progressão (3).

A progressão dos tumores de bexiga para carcinomas invasivos faz com que a doença torne-se potencialmente letal, sendo necessário tratamento agressivo, e menos de 15% dos pacientes com carcinomas invasivos sobrevivem dois anos, quando não tratados (9).

Após a remoção cirúrgica do tumor, cerca de metade dos pacientes apresenta recorrência em um período de 5 anos, sendo que entre 16 e 25% dos tumores recorrem como alto grau, observando-se então um pior prognóstico (10).

As variáveis patológicas e clínicas que são utilizadas atualmente para obtenção de informações prognósticas no câncer de bexiga possuem limitações na capacidade de avaliação do verdadeiro potencial maligno da maioria dos tumores (10). Com isso, pesquisas que forneçam detalhes a respeito da biologia molecular do câncer de bexiga, podem permitir uma maior compreensão desta doença em diferentes populações, prognósticos mais detalhados e otimização do tratamento, melhorando com isso, as respostas e a qualidade de vida do paciente (11).

Um grande número de estudos tem procurado marcadores, buscando uma associação entre genes responsáveis pela metabolização de xenobióticos e pelo reparo do DNA e o desenvolvimento de câncer, incluindo o de bexiga (12). Uma das abordagens utilizadas na busca por marcadores é através do estudo de polimorfismos, que são variações na sequência do DNA, como substituições de nucleotídeos, inserções ou deleções, e que ocorrem na população em uma frequência de, no mínimo, 1%. Estas alterações podem ou não causar alterações na função de proteínas e no fenótipo (13).

Polimorfismos já descritos nos genes *GSTM1* (deleção), *GSTT1* (deleção), *GSTP1* (rs1695), *CYP1A1* (rs1048943) e *MGMT* (rs2308321 e rs2308327) vêm sendo

intensamente estudados, relacionando-os com o desenvolvimento e progressão de diversas neoplasias (14-18).

Existem evidências de que os genótipos nulos de *GSTMI* e *GSTTI* contribuem com um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga, apesar de muitos resultados conflitantes serem encontrados na literatura (19,20). A relação do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* com o câncer de bexiga é também bastante controversa, havendo relatos de um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga (21,22) ou nenhuma relação significativa (23-26). No único estudo encontrado na literatura que relaciona o polimorfismo rs1048943 do gene *CYP1A1* com o câncer de bexiga, nenhuma evidência de associação foi observada (27), mas a participação desta enzima na ativação de pró-carcinógenos do tabaco, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas aromáticas (28), torna evidente a importância de seu estudo. Com relação aos polimorfismos rs2308321 e rs2308327 do gene *MGMT*, nenhum estudo com o câncer de bexiga foi encontrado. Contudo, ambos os polimorfismos estão localizados muito próximos ao sítio de atividade Cys145 da enzima, o que evidencia a importância de seu estudo (29).

O objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação do tipo caso-controle em uma população brasileira, verificando as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos genes *CYP1A1*(rs1048943; Ile462Val), *MGMT* (rs2308321; Ile143Val e rs2308327 Lys178Arg), *GSTP1*(rs1695; Ile105Val) e frequências das deleções completas dos genes *GSTMI* e *GSTTI*, buscando possíveis marcadores de suscetibilidade e progressão para tumores uroteliais de bexiga urinária.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Amostra***

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e as amostras foram coletadas apenas após cada participante assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Um total de 129 pacientes com confirmação histológica de carcinoma urotelial de bexiga e 129 indivíduos controle livres de neoplasia foram incluídos no estudo. Os indivíduos controle, todos de base hospitalar, porém sem histórico de neoplasias, eram originários da mesma região geográfica dos pacientes, e foram pareados por idade ( $\pm 5$  anos), gênero, grupo étnico e hábito tabagista. Os detalhes sobre estilo de vida, etnia, idade, ocupação e histórico familiar

de câncer foram obtidos por meio de entrevistas diretas e consultas a prontuários dos pacientes. A classificação dos grupos étnicos foi realizada de acordo com as categorias étnico-raciais consideradas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (30). A classificação do hábito tabagista foi realizada em duas categorias: fumantes foram considerados aqueles que fumam ou pararam de fumar há menos de 10 anos, e não-fumantes aqueles que nunca fumaram ou deixaram de fumar há, no mínimo, 10 anos (31). Com relação à exposição ocupacional a agroquímicos, foram considerados expostos os indivíduos que afirmaram já terem trabalhado com algum tipo de agroquímico por no mínimo 1 ano, e não expostos aqueles que afirmaram nunca terem feito uso de qualquer tipo de agroquímico ou que utilizaram por menos de 1 ano (32). Os parâmetros clínicos avaliados foram a graduação histológica (baixo ou alto grau) e a invasão da camada muscular, sendo estes os principais fatores prognósticos para o paciente. Todas as informações foram obtidas a partir dos laudos anátomo-patológicos emitidos por médicos patologistas.

### ***Extração do DNA e genotipagem***

O DNA genômico de cada indivíduo foi obtido a partir de 5 mL de sangue periférico através da ação enzimática da proteinase K (10 mg/mL) e posterior purificação com solventes orgânicos (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - Life Technologies), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas após a extração foram quantificadas em fluorímetro *Qubit* (Life Technologies), utilizando-se o kit *Quant-iT dsDNA* e foram padronizadas para serem utilizadas na concentração de 10 ng/μL. Os polimorfismos estudados e as respectivas metodologias utilizadas são apresentados na Tabela 1. Foram utilizados DNAs controle, com genótipos conhecidos dos SNPs avaliados, para verificar a confiabilidade dos resultados obtidos. Duplicatas para controle de qualidade foram incluídas aleatoriamente nas reações de genotipagem.

### ***Análise estatística***

As frequências dos polimorfismos foram determinadas através da contagem direta dos genótipos e alelos. Para as análises foi utilizado o *software Bioestat 5.0*. Desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e comparação das características entre os grupos caso e controle foram avaliados através do teste de Qui-quadrado. Comparações das frequências genotípicas e alélicas observadas no grupo de pacientes e controles foram realizadas através

do cálculo das *Odds ratios* (ORs) com 95% de intervalo de confiança. Os genótipos e alelos prevalentes foram tomados como referência (OR=1) para determinar o valor dos outros genótipos e alelos. Uma probabilidade ( $P$ )<0,05 foi adotada para o resultado ser considerado estatisticamente significativo.

**Tabela 1** – Descrição dos polimorfismos estudados, seus respectivos genótipos e metodologias para análise

Gene	Polimorfismo (substituição do aminoácido)	Nº referência do SNP	Genótipos	Metodologias utilizadas
<i>MGMT</i>	A > G (Ile143Val)	rs2308321	AA AG GG	PCR tempo real (TaqMan) (43)
<i>MGMT</i>	A > G (Lys178Arg)	rs2308327	AA AG GG	PCR tempo real (TaqMan) (43)
<i>GSTT1</i>	Deleção	---	Nulo Não nulo	PCR multiplex (44)
<i>GSTM1</i>	Deleção	---	Nulo Não nulo	PCR multiplex (44)
<i>GSTP1</i>	A > G (Ile105Val)	rs1695	AA AG GG	PCR tempo real (TaqMan) (43)
<i>CYP1A1</i>	A > G (Ile462Val)	rs1048943	AA AG GG	PCR alelo específica (45)

## RESULTADOS

A amostra foi composta por 99 indivíduos do sexo masculino e 30 do sexo feminino tanto no grupo de pacientes como nos controles. Entre os pacientes, 73,6% possuíam mais de 60 anos de idade e 26,4% 60 anos ou menos. Já entre os controles, 69,8% apresentavam mais de 60 anos e 30,2% 60 anos ou menos. Com relação à etnia, 92,2% dos casos e controles foram considerados brancos ou pardos e 7,8% foram considerados negros.

Foram considerados não fumantes, 53,5% dos indivíduos dos grupos de pacientes e controles e 46,5% foram considerados fumantes. Considerando o pareamento

realizado entre os grupos de casos e controles, não foi observada diferença significativa entre gênero, etnia, hábito tabagista e idade ( $P > 0,05$ ).

Entre as características demográficas avaliadas, a única para a qual não foi realizado o pareamento entre casos e controles, foi a exposição ocupacional a agroquímicos. Entre os pacientes, 45,5% dos indivíduos afirmaram já ter se exposto ocupacionalmente a agroquímicos, enquanto que entre os controles esse valor foi de 39,2%. A diferença entre os grupos, entretanto, não foi estatisticamente significativa ( $P = 0,378$ ). Todas as frequências genóticas obtidas estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, com exceção da distribuição no grupo controle do polimorfismo do gene *CYP1A1*, que apresentou uma diferença significativa ( $P = 0,00001$ ). Os dois polimorfismos do gene *MGMT* apresentaram um completo desequilíbrio de ligação.

As frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos analisados no grupo de pacientes e controles, os valores de  $P$  e  $OR$  são apresentados na Tabela 2.

Comparações entre os grupos de pacientes e controles foram realizadas levando-se em consideração o hábito tabagista e a exposição ocupacional a agroquímicos (Tabelas 3 e 4, respectivamente), e também entre aqueles pertencentes a ambos os grupos. Tais comparações podem fornecer indícios da relação destes fatores com os polimorfismos analisados e com a suscetibilidade ao câncer de bexiga. Nota-se que entre os fumantes, o genótipo raro do gene *GSTP1* apresenta um efeito protetor significativo ( $OR=0,15$ ;  $IC\ 95\%=0,03-0,76$ ) na suscetibilidade ao câncer de bexiga. Inversamente, o genótipo nulo do gene *GSTT1* aumentou significativamente em 3,78 vezes ( $OR=3,78$ ;  $IC\ 95\%=1,64-8,70$ ) a suscetibilidade ao câncer de bexiga. Entre os indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos, novamente a deleção no gene *GSTT1*, além do genótipo heterozigoto no gene *CYP1A1*, apresentaram associação com um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga [ $(OR=3,08$ ;  $IC\ 95\%=1,23-7,70$ ) e  $(OR=6,34$ ;  $IC\ 95\%=1,33-30,33$ ), respectivamente]. Entre os indivíduos fumantes e ocupacionalmente expostos a agroquímicos, a deleção no gene *GSTT1* demonstrou a mesma associação observada anteriormente, embora uma suscetibilidade ao câncer de bexiga ainda maior tenha sido encontrada ( $OR=5,53$ ;  $IC\ 95\%=1,59-19,27$ ). Foram realizadas análises de associação entre os genótipos dos diferentes genes em conjunto e a suscetibilidade ao câncer de bexiga. Contudo, nenhum dos resultados obtidos se mostrou significativo. Com relação à progressão tumoral, nenhum dos polimorfismos demonstrou qualquer associação significativa com os parâmetros avaliados (dados não apresentados).

**Tabela 2** – Comparação da distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos estudados entre pacientes e controles

Alelos e genótipos	Controles (%)	Casos (%)	<i>P</i>	OR (IC 95%)
<i>MGMT</i> (rs2308321)				
AA	96 (76,2)	101 (80,2)		Referência
AG	30 (23,8)	24 (19)	0,462	0,76 (0,42-1,39)
GG	0 (0)	1 (0,8)		---
AG + GG	30 (23,8)	25 (19,8)	0,542	0,79 (0,43-1,44)
A	222 (88,1)	226 (89,7)		Referência
G	30 (11,9)	26 (10,3)	0,671	0,85 (0,49-1,49)
<i>MGMT</i> (rs2308327)				
AA	96 (76,2)	101 (80,2)		Referência
AG	30 (23,8)	24 (19)	0,462	0,76 (0,42-1,39)
GG	0 (0)	1 (0,8)		---
AG + GG	30 (23,8)	25 (19,8)	0,542	0,79 (0,43-1,44)
A	222 (88,1)	226 (89,7)		Referência
G	30 (11,9)	26 (10,3)	0,671	0,85 (0,49-1,49)
<i>GSTPI</i> (rs1695)				
AA	59 (53,2)	69 (62,2)		Referência
AG	39 (35,1)	36 (32,4)	0,505	0,79 (0,45-1,40)
GG	13 (11,7)	6 (5,4)	0,116	0,39 (0,14-1,10)
AG + GG	52 (46,8)	42 (37,8)	0,221	0,69 (0,40-1,18)
A	157 (70,7)	174 (78,4)		Referência
G	65 (29,3)	48 (21,6)	0,08	0,67 (0,43-1,03)
<i>CYP1A1</i> (rs1048943)				
AA	84 (73)	79 (68,7)		Referência
AG	20 (17,4)	30 (26,1)	0,206	1,59 (0,84-3,04)
GG	11 (9,6)	6 (5,2)	0,435	0,58 (0,20-1,64)
AG + GG	31 (27)	36 (31,3)	0,562	1,23 (0,70-2,18)
A	188 (81,7)	188 (81,7)		Referência
G	42 (18,3)	42 (18,3)	1,000	1,00 (0,62-1,60)
<i>GSTT1</i>				
Não-nulo	79 (67,5)	66 (56,4)		Referência
Nulo	38 (32,5)	51 (43,6)	0,106	1,61 (0,94-2,74)
<i>GSTM1</i>				
Não-nulo	67 (57,3)	67 (57,3)		Referência
Nulo	50 (42,7)	50 (42,7)	1,000	1,00 (0,60-1,68)

Nota: Por dificuldades metodológicas o N amostral pode variar entre os polimorfismos analisados

**Tabela 3** – Comparação entre pacientes e controles da distribuição genotípica dos polimorfismos estudados em relação ao hábito tabagista

Genótipos	Não fumantes N = 69 <sup>a</sup>			Fumantes N = 60 <sup>a</sup>		
	Controles (%)	Casos (%)	OR (IC 95%)	Controles (%)	Casos (%)	OR (IC 95%)
<i>MGMT</i> (rs2308321)						
AA	46 (67,6)	52 (76,5)	Referência	50 (86,2)	49 (84,5)	Referência
AG	22 (32,4)	15 (22,1)	0,60 (0,28-1,30)	8 (13,8)	9 (15,5)	1,15 (0,41-3,22)
GG	0 (0)	1 (1,5)	---	0 (0)	0 (0)	---
AG + GG	22 (32,4)	16 (23,5)	0,64 (0,30-1,37)	8 (86,2)	9 (15,5)	1,15 (0,41-3,22)
<i>MGMT</i> (rs2308327)						
AA	46 (67,6)	52 (76,5)	Referência	50 (86,2)	49 (84,5)	Referência
AG	22 (32,4)	15 (22,1)	0,60 (0,28-1,30)	8 (13,8)	9 (15,5)	1,15 (0,41-3,22)
GG	0 (0)	1 (1,5)	---	0 (0)	0 (0)	---
AG + GG	22 (32,4)	16 (23,5)	0,64 (0,30-1,37)	8 (86,2)	9 (15,5)	1,15 (0,41-3,22)
<i>GSTPI</i> (rs1695)						
AA	36 (58,1)	35 (56,5)	Referência	23 (46,9)	34 (69,4)	Referência
AG	22 (35,5)	23 (37,1)	1,07 (0,51-2,27)	17 (34,7)	13 (26,5)	0,52 (0,21-1,27)
GG	4 (6,4)	4 (6,4)	1,03 (0,24-4,44)	9 (18,4)	2 (4,1)	0,15 (0,03-0,76)*
AG + GG	26 (41,9)	27 (43,5)	1,07 (0,52-2,18)	26 (53,1)	15 (30,6)	0,39 (0,17-0,89)*
<i>CYP1A1</i> (rs104894)						
AA	49 (76,6)	41 (64,1)	Referência	35 (70)	37 (74)	Referência
AG	11 (17,2)	20 (31,2)	2,17 (0,93-5,06)	8 (16)	10 (20)	1,18 (0,42-3,34)
GG	4 (6,2)	3 (4,7)	0,90 (0,19-4,24)	7 (14)	3 (6)	0,40 (0,10-1,69)
AG + GG	15 (23,4)	23 (35,9)	1,83 (0,85-3,96)	15 (30)	13 (26)	0,82 (0,34-1,97)
<i>GSTT1</i>						
Não-nulo	40 (61,5)	43 (66,2)	Referência	39 (75)	23 (44,2)	Referência
Nulo	25 (38,5)	22 (33,8)	0,82 (0,40-1,68)	13 (25)	29 (55,8)	3,78 (1,64-8,70)*
<i>GSTM1</i>						
Não-nulo	36 (55,4)	35 (53,8)	Referência	31 (59,6)	32 (61,5)	Referência
Nulo	29 (44,6)	30 (46,2)	1,06 (0,53-2,12)	21 (40,4)	20 (38,5)	0,92 (0,42-2,03)

\* Resultados estatisticamente significativos

Nota: Por dificuldades metodológicas o N amostral pode variar entre os polimorfismos analisados

**Tabela 4** – Comparação entre pacientes e controles da distribuição genotípica dos polimorfismos estudados em relação à exposição ocupacional a agroquímicos

Genótipos	Não expostos			Expostos		
	Controles (%) N = 74	Casos (%) N = 64	OR (IC 95%)	Controles (%) N = 45	Casos (%) N = 55	OR (IC 95%)
<i>MGMT</i> (rs2308321)						
AA	55 (76,4)	49 (79)	Referência	33 (76,7)	44 (81,5)	Referência
AG	17 (23,6)	12 (19,4)	0,79 (0,34-1,82)	10 (23,3)	10 (18,5)	0,75 (0,28-2,01)
GG	0 (0)	1 (1,6)	---	0 (0)	0 (0)	---
AG + GG	17 (23,6)	13 (21)	0,86 (0,38-1,95)	10 (23,3)	10 (18,5)	0,75 (0,28-2,01)
<i>MGMT</i> (rs2308327)						
AA	55 (76,4)	49 (79)	Referência	33 (76,7)	44 (81,5)	Referência
AG	17 (23,6)	12 (19,4)	0,79 (0,34-1,82)	10 (23,3)	10 (18,5)	0,75 (0,28-2,01)
GG	0 (0)	1 (1,6)	---	0 (0)	0 (0)	---
AG + GG	17 (23,6)	13 (21)	0,86 (0,38-1,95)	10 (23,3)	10 (18,5)	0,75 (0,28-2,01)
<i>GSTPI</i> (rs1695)						
AA	35 (53,8)	33 (62,3)	Referência	21 (58,3)	28 (58,3)	Referência
AG	25 (38,5)	18 (33,9)	0,76 (0,35-1,65)	9 (25)	16 (33,3)	1,33 (0,49-3,60)
GG	5 (7,7)	2 (3,8)	0,42 (0,08-2,34)	6 (16,7)	4 (8,4)	0,50 (0,13-2,00)
AG + GG	30 (46,2)	20 (37,7)	0,71 (0,34-1,48)	15 (41,7)	20 (41,7)	1,00 (0,42-2,40)
<i>CYP1A1</i> (rs1048943)						
AA	49 (71,1)	40 (71,4)	Referência	29 (78,4)	32 (64)	Referência
AG	15 (21,7)	14 (25)	1,14 (0,49-2,65)	2 (5,4)	14 (28)	6,34 (1,33-30,33)*
GG	5 (7,2)	2 (3,6)	0,49 (0,09-2,66)	6 (16,2)	4 (8)	0,60 (0,15-2,36)
AG + GG	20 (28,9)	16 (28,6)	0,98 (0,45-2,14)	8 (21,6)	18 (36)	2,04 (0,77-5,39)
<i>GSTT1</i>						
Não-nulo	44 (62)	36 (61)	Referência	31 (77,5)	28 (52,8)	Referência
Nulo	27 (38)	23 (39)	1,04 (0,51-2,12)	9 (22,5)	25 (47,2)	3,08 (1,23-7,70)*
<i>GSTM1</i>						
Não-nulo	39 (54,9)	37 (62,7)	Referência	23 (57,5)	28 (47,2)	Referência
Nulo	32 (45,1)	22 (37,3)	0,72 (0,36-1,47)	17 (42,5)	25 (52,8)	1,21 (0,53-2,76)

\* Resultados estatisticamente significativos

Nota: Por dificuldades metodológicas o N amostral pode variar entre os polimorfismos analisados

## DISCUSSÃO

O câncer de bexiga possui uma forte relação com exposição ocupacional e ambiental a carcinógenos químicos. Portanto, polimorfismos genéticos em genes do biometabolismo e reparo do DNA podem ser responsáveis por diferenças na suscetibilidade a este câncer (33). Diversos estudos de associação entre alguns dos polimorfismos analisados no presente trabalho e o câncer de bexiga foram encontrados na literatura, entretanto, muita divergência foi observada (19-26,34).

Quando a população do presente estudo foi avaliada como um todo, não se observou qualquer associação entre os polimorfismos dos genes *MGMT* (OR=0,79; IC 95%=0,43-1,44), *CYP1A1* (OR=1,23; IC 95%=0,70-2,18), *GSTP1* (OR=0,69; IC 95%=0,40-1,18), *GSTMI* (OR=1,00; IC 95%=0,60-1,68) e *GSTT1* (OR=1,61; IC 95%=0,94-2,74) com a suscetibilidade ao câncer de bexiga (Tabela 2). Tais resultados corroboram os achados de Cengiz e colaboradores (34), que não encontraram associação entre o genótipo nulo do gene *GSTT1* e a suscetibilidade ao câncer de bexiga (OR=2,08; IC 95%=0,87-5,01); o de Figueroa e colaboradores (27), que não encontraram associação do polimorfismo rs1048943 do gene *CYP1A1* com o câncer de bexiga (OR=1,02; IC 95%=0,70-1,47) e o de Altayli e colaboradores (23), que observaram ausência de associação entre a deleção no gene *GSTMI* e este câncer (OR=0,93; IC 95%=0,54-1,58).

Em contraste com nossos resultados, Zhang e colaboradores (20) demonstraram uma pequena associação do gene *GSTMI* com o aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga (OR=1,46; IC 95%=1,35-1,57). Zeng e colaboradores sugeriram que o genótipo nulo do gene *GSTT1* também está associado a um pequeno aumento na suscetibilidade (OR=1,12; IC 95%=1,04-1,21) a este câncer (19). Kellen e colaboradores (21) demonstraram, em uma meta-análise, que o polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* está relacionado a um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga (OR=2,17; IC 95%=1,27-3,71). Quando os estudos utilizados nesta meta-análise são verificados individualmente, é possível perceber que existe muita variação entre os resultados para o polimorfismo rs1695 (22-26).

Os resultados contrastantes obtidos em nosso estudo podem ser causados por alguns fatores de confusão, como a miscigenação da população brasileira. Um exemplo da influência da etnia na suscetibilidade ao câncer são os achados de Carlsten e colaboradores (42), que observaram que, enquanto o genótipo nulo do gene *GSTMI* conferiu um aumento significativo no risco de desenvolvimento de câncer de pulmão em asiáticos do leste

(OR=1,38; IC 95%=1,24-1,55), o mesmo genótipo não conferiu risco algum a caucasianos (OR=1,04; IC 95%=0,97-1,11).

Nenhum estudo de associação foi encontrado na literatura que relacionasse os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 do gene *MGMT* com o câncer de bexiga. Entretanto, Ma e colaboradores (35) indicaram não haver diferença entre os genótipos selvagem e raro quanto à atividade de reparo do DNA, o que pode esclarecer a inexistência de associação entre ambos os polimorfismos analisados e o câncer de bexiga observada no presente estudo.

O hábito tabagista é o principal fator de risco independente para o câncer de bexiga, sendo responsável por 50% dos casos entre homens e 35% entre mulheres (36). Por esta razão, a amostra foi dividida entre fumantes e não fumantes, e a análise de suscetibilidade foi realizada em ambos os grupos separadamente (Tabela 3). Foi possível observar que entre os fumantes, o alelo raro (OR=0,38; IC 95%=0,19-0,74) e o genótipo raro do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* (OR=0,15; IC 95%=0,03-0,76) apresentaram efeito de proteção. Tal efeito foi encontrado também por Gsur e colaboradores (37) na suscetibilidade ao câncer de próstata (OR=0,24; IC 95%=0,09-0,61). As enzimas da família GST estão geralmente associadas ao processo de detoxificação, mas elas também podem estar envolvidas na ativação de alguns metabólitos oxidativos (38). O polimorfismo rs1695 pode reduzir a ação da enzima *GSTP1*, diminuindo, com isso, a ativação de tais metabólitos e, conseqüentemente, seus efeitos genotóxicos. Portanto, esta pode ser uma explicação para o efeito protetor encontrado. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer o envolvimento da enzima *GSTP1* com o câncer de bexiga.

Entre os indivíduos fumantes foi observado que a deleção do gene *GSTT1* apresentou associação com um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga (OR=3,78; IC 95%=1,64-8,70). Este achado é justificado pela afirmação de Rand e colaboradores (39) de que polimorfismos no gene *GSTT1* podem afetar o processo de detoxificação metabólica da fumaça do cigarro, podendo ocorrer um acúmulo de metabólitos e um aumento na frequência de danos no DNA em indivíduos portadores do genótipo nulo.

Da mesma forma como realizado para o hábito tabagista, os pacientes e controles foram divididos em grupos, conforme a exposição ocupacional a agroquímicos (Tabela 4). Os polimorfismos analisados nos genes *GSTT1* e *CYP1A1* demonstraram associação com o aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga no grupo dos indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos [(OR=3,08; IC 95%=1,23-7,70) e (OR=6,34; IC 95%=1,33-30,33), respectivamente]. Sabe-se que as enzimas da família GST estão envolvidas

na detoxificação de agroquímicos (40), que podem apresentar possível atividade carcinogênica. Nossos resultados demonstram um aumento na suscetibilidade ao câncer de bexiga relacionado com a deleção do gene *GSTT1*, indicando a importância deste gene na detoxificação desses compostos. Em relação ao gene *CYP1A1*, em um estudo realizado por Tsatsakis e colaboradores (41) em uma população grega ocupacionalmente exposta a agroquímicos, foi observada uma associação entre polimorfismos deste gene e uma série de problemas de saúde, como problemas circulatórios, aborto, artrite, alergia, entre outros. Isto indica a possível influência dos polimorfismos deste gene na metabolização de agroquímicos, o que pode levar ao aumento da suscetibilidade ao câncer de bexiga em indivíduos ocupacionalmente expostos a esses compostos, como observado em nosso estudo. Entretanto, a distribuição dos genótipos no grupo controle para o polimorfismo do gene *CYP1A1* não se encontrava em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, sendo necessárias, portanto, análises adicionais deste resultado em mais indivíduos e em diferentes populações, para uma maior compreensão do desequilíbrio observado.

Foram analisados também, indivíduos que eram ao mesmo tempo fumantes e ocupacionalmente expostos a agroquímicos, com o intuito de verificar se estes dois fatores, associados aos polimorfismos, poderiam representar um risco ainda maior ao câncer de bexiga. Nesta análise, a deleção do gene *GSTT1* foi associada a um aumento na suscetibilidade ainda maior do que o observado nas análises anteriores (OR=5,53; IC 95%=1,59-19,27), indicando um efeito aditivo, pois cada um dos fatores parece contribuir com um aumento no risco, possivelmente devido a um acúmulo ainda maior de metabólitos reativos, associado a uma deficiência na capacidade de metabolizar tais compostos.

Nenhum polimorfismo estudado apresentou qualquer associação com a progressão tumoral. Entretanto, a falta de informação existente em diversos laudos anátomo-patológicos obtidos junto aos médicos patologistas acarretou em um tamanho amostral bastante reduzido nesta análise (Grau histológico N=48; Invasão muscular N=36), o que pode ser considerado um fator de confusão para esta análise. Em uma revisão de Bryan e colaboradores (11), foram apontados alguns genes que podem exercer um papel importante na progressão do câncer de bexiga, como *FGFR3*, *EGFR*, *pRB*, *TP53*, *Ki-67*, *VEGF* e *CK20* e que devem ser alvos para próximos estudos.

Entre os genes analisados no presente estudo, o gene *GSTT1* foi o que se mostrou mais fortemente associado ao câncer de bexiga em indivíduos expostos a compostos carcinogênicos derivados do cigarro, de agroquímicos ou expostos a ambos. Portanto, este gene, além de ser considerado fundamental na manutenção da integridade genômica (23) e

consequentemente, possuir importância na genotoxicidade, pode apresentar importante papel na carcinogênese de tumores uroteliais de bexiga urinária.

Em conclusão, os polimorfismos analisados dos genes *CYP1A1* e *GSTP1* apresentaram associação com a suscetibilidade ao câncer de bexiga em, respectivamente, indivíduos expostos a agroquímicos e ao tabaco e devem ser alvos de estudos futuros para esclarecer seu papel nesta neoplasia. O genótipo nulo do gene *GSTT1* demonstrou forte associação positiva com o câncer de bexiga em pacientes fumantes, ocupacionalmente expostos a agroquímicos e àqueles pertencentes a ambos os grupos. Portanto, este genótipo apresenta potencial como marcador de suscetibilidade. Os resultados aqui apresentados podem contribuir para a compreensão da suscetibilidade individual ao câncer de bexiga urinária na população brasileira.

### **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelas bolsas concedidas à Lengert AH, Souza MF e Kuasne H; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa produtividade para Colus IMS; aos médicos urologistas do Hospital do Câncer de Londrina e Hospital Universitário da UEL; Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema; Irmandade Santa Casa de Londrina; à Dra. Regina Célia Poli-Frederico (Universidade Norte do Paraná) pelas amostras cedidas de pacientes e controles.

## REFERÊNCIAS

1. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61, 69-90.
2. INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2011. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home/>>. Acesso em: 15 janeiro 2012.
3. Matheus, W.E. Câncer de Bexiga Pta, Ptis e Pt1. In: Nardozza Júnior, A.; Zerati Filho, M.; Reis, R.B. *Urologia Fundamental*. Planmark Editora: São Paulo, 2010. cap. 17.
4. Zeegers, M.P.; Tan, F.E.; Dorant, E.; van Den Brandt, P.A. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000, 89(3), 630-639.
5. Quirk, J.T.; Li, Q.; Natarajan, N.; Mettlin, C.J.; Cummings, K.M. Cigarette Smoking and the Risk of Bladder Cancer in Men and Women. *Tobacco Induced Diseases* 2004, 2(3), 141-144.
6. Olfert, S.M.; Felknor, S.A.; Delclos, G.L. An Updated Review of the Literature: Risk Factors for Bladder Cancer with Focus on Occupational Exposures. *Southern Medical Journal* 2006, 99(11), 1256-1263.
7. Reuter, V.E. The Pathology of Bladder Cancer. *Urology* 2006, 67, 11-18.
8. Epstein, J.I.; Amin, M.B.; Reuter, V.R.; Mostofi, F.K. The World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. Bladder Consensus Conference Committee. *Am J Surg Pathol* 1998, 22(12), 1435-1448.
9. Pompeo, A.C.L.; Carrerette, F.B.; Glina, S.; Ortiz, V.; Ferreira, U.; Fonseca, C.E.C.; Wroclawski, E.R.; Bretas, F.F.H.; Snitcovsky, I.; Coelho, J.M.C.; Fonseca F°, L.L.; Berger, M.; Monti, P.R.; Matheus, W.E.; Clark, O.; Freitas, L.A.R. Câncer de Bexiga - Parte II. In: Sociedade Brasileira de Urologia e Sociedade Brasileira de Patologia. *Projeto Diretrizes* 2006. Disponível em: <[http://www.projetodiretrizes.org.br/6\\_volu me/07-CancerBexiga2.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/6_volu me/07-CancerBexiga2.pdf)>. Acesso em: 12 outubro 2011.
10. Kim, W.J.; Bae, S.K. Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Sci* 2008, 99(4), 646-652.
11. Bryan, R.T.; Zeegers, M.P.; James, N.D.; Wallace, D.M.A.; Cheng, K.K. Biomarkers in bladder cancer. *BJU International* 2009, 105, 608-613.
12. Srivastava, D.S.L.; Mishra, D.K.; Mandhani, A.; Mittal, B.; Kumar, A.; Mittal, R.D. Association of Genetic Polymorphism of Glutathione S-transferase M1, T1, P1 and Susceptibility to Bladder Cancer. *European Urology* 2005, 48, 339-344.
13. Miller, M.C.; Mohrenweiser, H.W.; Bell, D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters* 2001, 120, 269-280.

14. Mo, Z.; Gao, Y.; Cao, Y.; Gao, F.; Jian, L. An updating meta-analysis of the *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* 2009, 69(6), 662-688.
15. Zhang, Z.J.; Hao, K.; Shi, R.; Zhao, G.; Jiang, G.X.; Song, Y.; Xu, X.; Ma, J. Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) and glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) null polymorphisms, smoking, and their interaction in oral cancer: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2011, 173(8), 847-857.
16. San Jose, C.; Cabanillas, A.; Benitez, J.; Carrillo, J.A.; Jimenez, M.; Gervasini, G. *CYP1A1* gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer* 2010, 10, 463.
17. Kvitko, K.; Gaspar, P.A.; Torres, M.R.; Hutz, M.H. *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology* 2006, 4, 613-616.
18. Christmann, M.; Kaina, B. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*): impact on cancer risk in response to tobacco smoke. *Mutat Res* 2011.
19. Zeng, F.F.; Liu, S.Y.; Wei, W.; Yao, S.; Zhu, S.; Li, K.; Wan, G.; Zhang, H.; Zhong, M.; Wang, B. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Clin Exp Med* 2010, 10, 59-68.
20. Zhang, R.G.; Xu, G.Y.; Chen, W.J.; Zhang, W.L. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer risk: a meta-analysis of 26 studies. *Mol Biol Rep* 2011, 38, 2491-2497.
21. Kellen, E.; Hemelt, M.; Broberg, K.; Golka, K.; Kristensen, V.N.; Hung, R.J.; Matullo, G.; Mittal, R.D.; Porru, S.; Povey, A.; Schulz, W.A.; Shen, J.; Buntinx, F.; Zeegers, M.P.; Taioli, E. Pooled Analysis and Meta-analysis of the Glutathione S-Transferase P1 Ile105Val Polymorphism and Bladder Cancer: A HuGE-GSEC Review. *Am J Epidemiol* 2007, 165, 1221-1230.
22. Cao, W.; Cai, L.; Rao, J.Y.; Pantuck, A.; Lu, M.L.; Dalbagni, G.; Reuter, V.; Scher, H.; Cordon-Cardo, C.; Figlin, R.A.; Belldegrun, A.; Zhang, Z.F. Tobacco Smoking, *GSTP1* Polymorphism, and Bladder Carcinoma. *Cancer* 2005, 104, 2400-2408.
23. Altayli, E.; Gunes, S.; Yilmaz, A.F.; Goktas, S.; Bek, Y. *CYP1A2*, *CYP2D6*, *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* gene polymorphisms in patients with bladder cancer in a Turkish population. *Int Urol Nephrol* 2009, 41, 259-266.
24. Saad, A.A.; O'Connor, P.J.; Mostafa, M.H.; Metwalli, N.E.; Cooper, D.P.; Povey, A.C.; Margison, G.P. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and bladder cancer risk in Egyptians. *Int J Biol Markers* 2005, 20(1), 69-72.
25. Broberg, K.; Bjork, J.; Paulsson, K.; Hoglund, M.; Albin, M. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis* 2005, 26(7), 1263-1271.
26. Harries, L.W.; Stubbins, M.J.; Forman, D.; Howard, G.C.W.; Wolf, C.R. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with

- susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997, 18(4), 641-644.
27. Figueroa, J.D.; Malats, N.; García-Closas, M.; Real, F.X.; Silverman, D.; Kogevinas, M.; Chanock, S.; Welch, R.; Dosemeci, M.; Lan, Q.; Tardon, A.; Serra, C.; Carrato, A.; García-Closas, R.; Castano-Vinyals, G.; Rothman, N. Bladder cancer risk and genetic variation in *AKR1C3* and other metabolizing genes. *Carcinogenesis* 2008, 29(10), 1955-1962.
  28. Ma, Q.; Lu, A.Y.H. *CYP1A* Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metabolism and Disposition* 2007, 35(7), 1009-1016.
  29. Egyházi, S.; Ma, S.; Smoczynski, K.; Hansson, J.; Platz, A.; Ringborg, U. Novel O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase SNPs: A Frequency Comparison of Patients With Familial Melanoma and Healthy Individuals in Sweden. *Human Mutation* 2002, 549.
  30. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Notas técnicas: Características Étnico-Raciais da População - um estudo das categorias de classificação de cor ou raça, 2008. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/caracteristicas\\_raciais/notas\\_tecnicas.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/caracteristicas_raciais/notas_tecnicas.pdf)>. Acesso em: 15 dezembro 2011.
  31. Franceschi, S.; Talamini, R.; Barra, S.; Barón, A.E.; Negri, E.; Bidoli, E.; Serraino, D.; Vecchia, C.L. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Research* 1990, 50, 6502-6507.
  32. Páldy, A.; Puskás, N.; Vincze, K.; Hadházi, M. Cytogenetic studies on rural populations exposed to pesticides. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1987, 187(3), 127-132.
  33. Franekova, M.; Halasova, E.; Bukovska, E.; Luptak, J.; Dobrota, D. Gene polymorphisms in bladder cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2008, 26, 1-8.
  34. Cengiz, M.; Ozaydin, A.; Ozkilic, A.C.; Dedekarginoglu, G. The investigation of *GSTT1*, *GSTM1* and *SOD* polymorphism in bladder cancer patients. *International Urology and Nephrology* 2007, 39(4), 1043-1048.
  35. Ma, S.; Egyházi, S.; Ueno, T.; Lindholm, C.; Kreklau, E.L.; Stierner, U.; Ringborg, U.; Hansson, J. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase expression and gene polymorphisms in relation to chemotherapeutic response in metastatic melanoma. *British Journal of Cancer* 2003, 89, 1517-1523.
  36. Knight, A.; Askling, J.; Ekblom, A. Cancer incidence in a population-based cohort of patients with Wegener's granulomatosis. *International Journal of Cancer* 2002, 100(1), 82-85.
  37. Gsur, A.; Haidinger, G.; Hinteregger, S.; Bernhofer, G.; Schatzl, G.; Madersbacher, S.; Marberger, M.; Vutuc, C.; Micksche, M. Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (*GSTP1*, *GSTM1* and *GSTT1*) and prostate cancer risk. *International Journal of Cancer* 2001, 95, 152-155.

38. Gibbs, G.W.; Amsel, J.; Soden, K. A cohort mortality study of cellulose triacetate-fiber workers exposed to methylene chloride. *J Occup Environ Med* 1996, 38, 693-697.
39. Rand, C.M.; Weese-Mayer, D.E.; Maher, B.S.; Zhou, L.; Marazita, M.L.; Berry-Kravis, E.M. Nicotine Metabolizing Genes *GSTT1* and *CYP1A1* in Sudden Infant Death Syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 2006, 140A, 1447-1452.
40. Hodgson, E.; Silver, I.S.; Butler, L.E.; Lawton, M.P.; Levi, P.E. Metabolism. In: Hayes, W.J.; Laws, E.R. (eds): *Handbook of Pesticides Toxicology*. Academic Press: San Diego, 1991, pp107-167.
41. Tsatsakis, A.M.; Zafiroopoulos, A.; Tzatzarakis, M.N.; Tzanakakis, G.N.; Kafatos, A. Relation of *PON1* and *CYP1A1* genetic polymorphisms to clinical findings in a cross-sectional study of a Greek rural population professionally exposed to pesticides. *Toxicology Letters* 2009, 186, 66-72.
42. Carlsten, C.; Sagoo, G.S.; Frodsham, A.J.; Burke, W.; Higgins, J.P.T. Glutathione S-Transferase M1 (*GSTM1*) Polymorphisms and Lung Cancer: A Literature-based Systematic HuGE Review and Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology* 2008, 167(7), 759–774.
43. TaqMan SNP Genotyping Assays: Protocol – Applied Biosystems. Disponível em: <[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_039281.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_039281.pdf)>. Acesso em: 10 outubro 2010.
44. Abdel-Rahman, S.Z.; El-Zein, R.A.; Anwar, W.A.; Au, W.W. A Multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett* 1996, 107(2), 229-233.
45. Drakoulis, N.; Cascorbi, I.; Brockmoller, J.; Gross, C.R.; Roots, J. Polymorphisms in the human *CYP1A1* gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin Investig* 1994, 72, 240-248.

**5 MANUSCRITO 3**

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO NOS GENES *GSTP1* E *MGMT* EM  
TUMORES DE BEXIGA POR CURVA DE *MELTING* DE ALTA RESOLUÇÃO  
(HRM)**

**Lengert AH, B.S., Souza MF, B.S., Kuasne H, M.S., Fuganti PE, M.D., Rodrigues MAF,  
M.D., Cólus IMS, Ph.D.**

- Artigo a ser submetido à revista: *Urologic Oncology – Seminars and Original Investigation*

ISSN: 1078-1439

Fator de impacto: 3,172

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO NOS GENES *GSTP1* E *MGMT* EM  
TUMORES DE BEXIGA POR CURVA DE *MELTING* DE ALTA RESOLUÇÃO  
(HRM)**

**Lengert AH, B.S.<sup>a</sup>, Souza MF, B.S.<sup>a</sup>, Kuasne H, M.S.<sup>a</sup>, Fuganti PE, M.D.<sup>c</sup>, Rodrigues  
MAF, M.D.<sup>b</sup>, Cólus IMS, Ph.D.<sup>a</sup>.**

**Resumo**

Modificações epigenéticas podem desempenhar um papel importante na carcinogênese da bexiga urinária. O silenciamento epigenético de genes do reparo e do biometabolismo pode afetar, respectivamente, a capacidade de reparo do DNA ou de metabolização de xenobióticos, podendo ocasionar um acúmulo de danos no DNA. O objetivo do presente estudo foi analisar o padrão de metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT*, em amostras de tecido tumoral e normal da bexiga, verificar se a metilação nestes genes pode desempenhar algum papel na carcinogênese desta neoplasia e se estes apresentam potencial como marcadores tumorais. Foram incluídas no presente estudo 39 amostras de tecido tumoral de bexiga e 4 amostras de tecido normal como controles. O DNA genômico foi extraído, modificado pelo bissulfato de sódio e a técnica de Curva de *Melting* de Alta Resolução (*Methylation-Sensitive High Resolution Melting*, MS-HRM) foi utilizada para a análise da metilação. Os níveis de metilação do gene *GSTP1* ficaram em torno de 0% para todas as amostras analisadas, não sendo observada diferença significativa entre amostras tumorais e normais. Já para o gene *MGMT* todas as amostras demonstraram um perfil de *melting* diferenciado em relação à curva padrão, indicando a presença de metilação heterogênea, entretanto, sem diferença significativa entre amostras tumorais e normais. A aplicação de MS-HRM demonstrou ser rápida e eficiente para investigar o status da metilação nos genes *GSTP1* e *MGMT*. A metilação no gene *GSTP1* não demonstrou associação com a carcinogênese da bexiga urinária e, portanto, tal modificação epigenética neste gene não possui potencial como biomarcador, enquanto que para o gene *MGMT* foi observado um padrão de metilação heterogênea que deve ser melhor avaliado.

**Palavras-chave:** Metilação. Câncer de Bexiga. *GSTP1*. *MGMT*. Epigenética. Biomarcadores.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela divisão e crescimento celular descontrolados. Células tumorais possuem uma alta taxa de proliferação em relação ao seu tecido normal correspondente e perdem frequentemente a capacidade de se submeterem à apoptose. Além disso, elas podem adquirir a capacidade de se separar do seu tecido original, podendo desenvolver metástases em outras regiões do corpo. As principais causas dessa desordem na

---

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral,

<sup>c</sup> Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Cirurgia

programação celular no câncer são modificações genéticas e epigenéticas [1]. Entre as modificações epigenéticas, a mais conhecida, e possivelmente a mais estável, é a metilação do carbono 5 da base citosina no dinucleotídeo 5'-CpG-3'. Existem regiões no genoma chamadas ilhas CpG, em que ocorre uma alta concentração deste dinucleotídeo, e quando localizadas em um promotor gênico, podem levar ao silenciamento do gene. A metilação do DNA, realizada pelas enzimas DNA-metiltransferases, é um dos componentes principais dos mecanismos regulatórios epigenéticos em mamíferos [2].

O silenciamento gênico pela hipermetilação de promotores é um evento comumente observado na carcinogênese. Modificações epigenéticas como a metilação do DNA têm sido reconhecidas como um mecanismo alternativo na hipótese de Knudson na qual é postulado que são necessários dois 'eventos' para a ocorrência da tumorigênese [3] e, recentemente foi sugerido que os eventos de metilação aberrante são iniciais no processo de tumorigênese. A hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais como *RUNX3*, *RASSF1A*, *p16*, *RARβ* e *E-caderina* tem sido descrita em carcinomas de células transicionais da bexiga. Além disso, a hipermetilação está associada com o desenvolvimento tumoral, estadiamento, recorrência, progressão e sobrevida no câncer de bexiga [4-8]. Estas descobertas sugerem que padrões específicos de metilação devem estar associados ao câncer de bexiga e possuem potencial para melhorar a compreensão molecular acerca deste tipo tumoral, podendo, também, auxiliar no diagnóstico, prognóstico e individualizar o tratamento[5].

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a análise de metilação, cada qual com suas vantagens e desvantagens [9]. Entre elas, a Curva de *Melting* de Alta Resolução (*Methylation-Specific High Resolution Melting*, MS-HRM) é uma nova ferramenta que se baseia nas propriedades de *melting* do DNA. O princípio deste método é que amostras de DNA com diferentes conteúdos de metil-citosina, podem ser diferenciadas pela análise de sua curva de *melting* após o tratamento com o bissulfito de sódio. Esta técnica faz uso de reagentes tradicionais de uma reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) e fluoróforos que se ligam ao DNA dupla-fita e que podem ser utilizados em concentrações saturantes sem inibir a PCR. MS-HRM consiste no monitoramento preciso da mudança de fluorescência, enquanto os duplex de DNA vão desnaturando com o aumento da temperatura. A análise de *melting* não permite distinguir o status de metilação de citosinas individualmente, mas pode indicar o nível de metilação do *amplicon* [10-12].

A utilização de técnicas como MS-HRM no estudo de genes que podem apresentar um papel na carcinogênese, como os do sistema de reparo do DNA ou do

biometabolismo vem sendo considerada de fundamental importância. Tais genes podem ser inativos ou terem sua efetividade reduzida através de mecanismos de silenciamento epigenético, afetando a capacidade de reparo do DNA ou de metabolização de xenobióticos, podendo levar a um acúmulo de danos no DNA [1].

A metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT* ainda não foi investigada em câncer de bexiga por uma técnica que possa estimar a quantidade de metilação em suas regiões promotoras.

O objetivo do presente estudo foi, então, analisar o padrão de metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT*, através da técnica de MS-HRM, em amostras de tecido tumoral e de tecido normal de bexiga urinária; verificar se a metilação destes genes pode desempenhar algum papel na carcinogênese da bexiga e se estes apresentam potencial como marcadores tumorais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL E NORMAL**

Foram obtidas 39 amostras de tecido tumoral removidas cirurgicamente, sendo que em 4 destas foi possível obter amostras do tecido normal adjacente da bexiga urinária, que serviram como controle nas análises moleculares. Informações adicionais de cada paciente foram obtidas por meio de entrevistas diretas e consultas a prontuários e laudos anátomo-patológicos.

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e as amostras foram coletadas apenas após cada participante assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### **2.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO E MODIFICAÇÃO DO DNA PELO BISSULFITO DE SÓDIO**

O DNA genômico de cada indivíduo foi obtido a partir de fragmentos de tecidos tumorais e normais da bexiga urinária. Inicialmente o tecido foi macerado em um tampão de lise (10mM tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA pH 8,0; 10mM NaCl; 2% Triton X100; 1% SDS), submetido à ação enzimática da proteinase K (10 mg/mL) e posteriormente purificado com solventes orgânicos (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - Life Technologies), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas após a extração foram

quantificadas em fluorímetro *Qubit* (Life Technologies), utilizando-se o kit *Quant-iT dsDNA* e foram padronizadas na concentração de 10 ng/ $\mu$ L.

Foram empregados 200ng do DNA genômico para a conversão pelo bissulfito de sódio com o kit *EZ DNA methylation-Gold* (ZymoResearch). A eficiência da conversão foi testada através de uma amplificação realizada com *primers* controle do gene *DAPK1*, que também integravam o kit. O DNA convertido foi utilizado na análise do MS-HRM.

Foram utilizados DNAs controles 100% e 0% metilado (ZymoResearch). A partir disso foram feitos padrões de metilação através da diluição do DNA controle 100% metilado. Com isso foram obtidos os padrões 75%, 50% e 25% metilados e estes, juntamente com os DNAs 100% e 0% metilado, constituíram a curva padrão e foram incluídos em todos os experimentos.

### 2.3 ANÁLISE POR MS-HRM

As metodologias de PCR e MS-HRM foram realizadas em um equipamento *ABI 7500 fast real-time PCR system* (Life Technologies). Os *primers* para os genes *GSTP1* e *MGMT* foram descritos por Wojdacz e colaboradores [11,12]. Foram priorizados *primers* que possuíssem CpGs em sua sequência, pois assim é possível direcionar o viés da PCR para as amostras metiladas através da manipulação da temperatura de anelamento dos *primers* [13]. A PCR foi realizada em um volume final de 20  $\mu$ l contendo: *MeltDoctor HRM Master Mix* (2X) (Life Technologies), 5  $\mu$ M de cada *primer* e 20ng de DNA genômico modificado pelo bissulfito de sódio. Cada reação foi realizada em triplicata. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguido por um passo de HRM de 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

Uma curva padrão com níveis de metilação conhecidos foi incluída em cada ensaio e utilizada para o cálculo dos níveis de metilação das amostras.

Os dados foram analisados através do *ABI high-resolution melting software* 2.0.1 (Life Technologies). Os gráficos foram gerados na forma de curvas de *melting* normalizadas e gráficos diferenciais de metilação. A análise estatística para verificar a existência de diferença entre os níveis de metilação foi realizada através do teste de Qui-quadrado com o *software Bioestat* 5.0. Uma probabilidade (P) <0,05 foi adotada para o resultado ser considerado estatisticamente significativo.

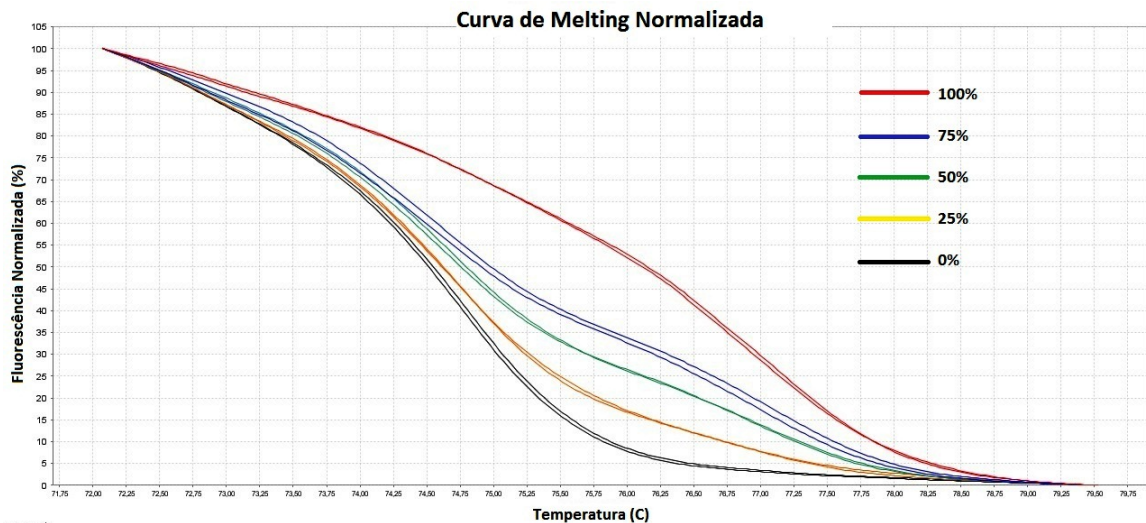
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 SENSIBILIDADE DA ANÁLISE DE MS-HRM

A sensibilidade da análise de MS-HRM para ambos os genes foi verificada pelo uso dos DNAs padrões, com níveis de metilação de 100%, 75%, 50%, 25% e 0%. Na temperatura de anelamento de 60°C, níveis de metilação tão baixos quanto 25% poderiam ser detectados facilmente (Figura 1).

O perfil de *melting* normalizado e o gráfico diferencial dos produtos das reações foram consistentes entre as réplicas. Além disso, algumas amostras foram utilizadas em diferentes corridas e os resultados foram reproduzíveis.

**Figura 1** – Curvas de *melting* normalizadas dos padrões 100%, 75%, 50%, 25% e 0% metilados. As amostras com diferentes níveis de metilação foram amplificadas com temperatura de anelamento de 60°C e submetidas à análise por HRM.



#### 3.2 NÍVEIS DE METILAÇÃO NOS GENES GSTP1 E MGMT EM AMOSTRAS TUMORAIS E NORMAIS

Os níveis de metilação do gene *GSTP1* ficaram em torno de 0% para todas as amostras analisadas, não sendo observada diferença significativa entre amostras tumorais e normais. Já para o gene *MGMT*, todas as amostras demonstraram um perfil diferenciado de *melting* em relação à curva padrão, indicando a presença de metilação heterogênea (Figura 2). Isto impossibilita estimar a quantidade de metilação, permitindo apenas uma interpretação qualitativa. O teste estatístico não indicou diferença significativa entre amostras tumorais e normais.

## 4 DISCUSSÃO

A análise por MS-HRM se tornou uma ferramenta rápida, simples e semiquantitativa da metilação do DNA [11]. MS-HRM é uma metodologia particularmente eficaz para a rápida análise de amostras, distinguindo as metiladas das não-metiladas, devido à diferença na composição de bases após a conversão pelo bissulfito e, conseqüentemente, distinguindo o comportamento de *melting* destas amostras [12].

A inativação epigenética por metilação na região promotora dos genes *GSTP1* e *MGMT* é muito bem estabelecida. O gene *GSTP1* está silenciado epigeneticamente em tumores de próstata [14,15] e o gene *MGMT* em vários tipos tumorais [16], como glioblastoma [17], câncer de cólon [18], carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço [19], entre outros. Isto demonstra a importância de se estabelecer com exatidão o perfil de metilação destes genes em tumores de bexiga.

No presente estudo, MS-HRM foi utilizado para analisar os níveis de metilação das regiões promotoras dos genes *GSTP1* e *MGMT* em amostras de tecido tumoral e normal da bexiga urinária. Os baixos níveis de metilação encontrados no gene *GSTP1* sugerem que a inativação deste gene por metilação não é um evento importante no processo de tumorigênese da bexiga.

Em estudos com tumores de bexiga, Maruyama e colaboradores [20] encontraram 11% dos tumores com metilação no gene *GSTP1* e 2% no gene *MGMT* e Chan e colaboradores [5] observaram 5,1% dos tumores com metilação tanto no gene *GSTP1* quanto no gene *MGMT*. Tais estudos indicam uma frequência muito baixa de metilação destes genes em tumores de bexiga. Entretanto, a análise da metilação nestes estudos foi realizada através da metodologia de *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction* (MSP), que apesar de ser o método mais amplamente utilizado para este propósito, é uma técnica qualitativa, o que impossibilita uma análise mais refinada dos resultados [21].

A metilação de um promotor é uma das formas melhor conhecidas de regulação epigenética para que ocorra o silenciamento gênico, e está claro que, em muitos tipos tumorais, os promotores encontram-se heterogeneamente metilados. Isto é uma importante questão tanto para a detecção quanto para a quantificação da metilação [22]. Segundo Mikeska e colaboradores [23], quando a técnica de MS-HRM é utilizada, este perfil heterogêneo impossibilita estimar a quantidade de metilação, permitindo apenas uma interpretação qualitativa dos dados. No presente estudo foi observado um perfil de *melting* diferenciado no gene *MGMT*, sendo que todas as amostras analisadas para este gene

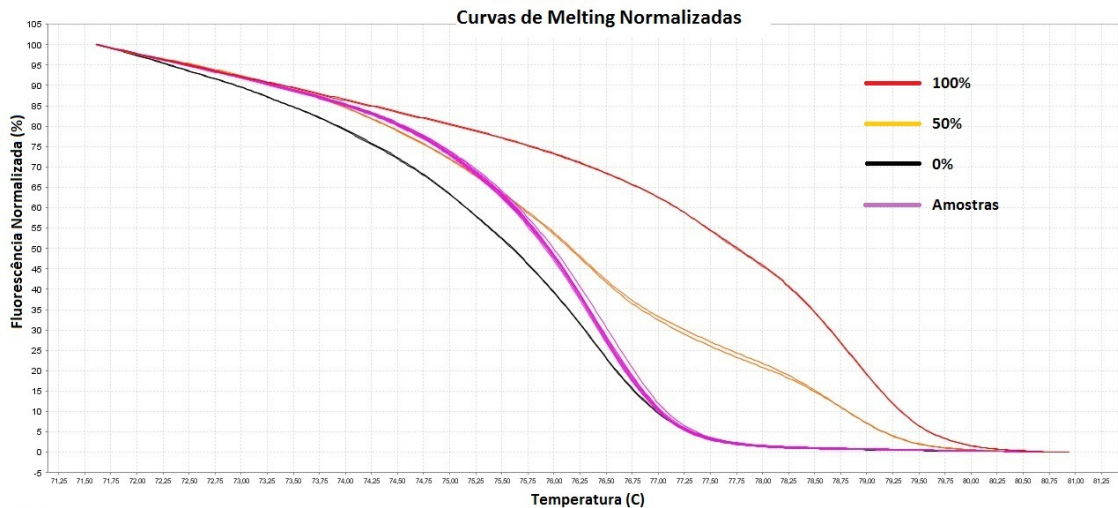
demonstraram um perfil complexo de *melting* em relação à curva padrão, indicando em todas elas a presença de metilação heterogênea (Figura 2A e B).

Em populações heterogeneamente metiladas, nas quais as moléculas diferem por uma, duas ou três bases, existe uma maior formação de heteroduplexes, que apresentarão características complexas de *melting* devido aos erros formados no pareamento. Em populações com metilação homogênea as diferenças entre os epialelos metilados e não metilados são muito grandes para que ocorra a formação de heteroduplexes após a reação de PCR. Assim, MS-HRM permite a rápida identificação de amostras com metilação heterogênea, devido ao padrão complexo de *melting* que surge com os heteroduplexes. Contudo, a quantificação da metilação em amostras com metilação heterogênea permanece sendo um problema, pois o padrão complexo exibido por estas amostras não pode ser comparado diretamente com os controles metilados e não metilados, já que estes apresentam uma metilação homogênea [22,24]. Com isso, MS-HRM possui uma limitação, mas também certa flexibilidade, pois pode ser utilizado tanto para estimar a quantidade de metilação em amostras com metilação homogênea, como para realizar uma triagem, selecionando os produtos com metilação heterogênea que necessitam de uma investigação quantitativa posterior, geralmente por métodos de sequenciamento [23].

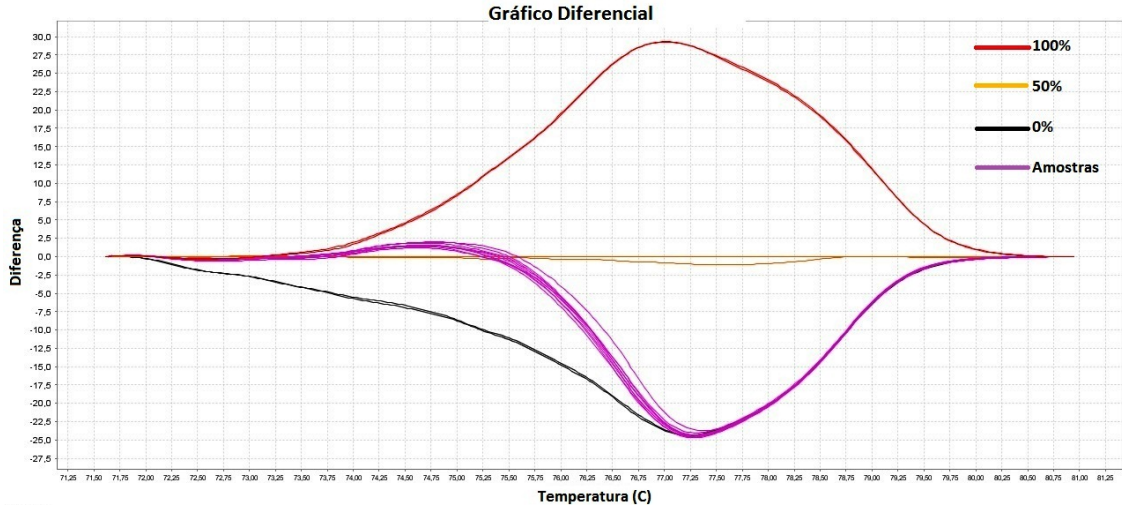
Em resumo, o presente estudo fornece novas evidências de que a metilação do gene *GSTP1* não possui relação com a tumorigênese da bexiga urinária. Além disso, observou-se metilação heterogênea no gene *MGMT* em amostras tumorais e normais. Investigações adicionais ainda são necessárias para quantificar a metilação no gene *MGMT* e verificar seu papel na carcinogênese da bexiga e seu potencial como biomarcador.

**Figura 2** – Curvas de *melting* normalizadas da região promotora do gene *MGMT* dos padrões 100%, 50% e 0% metilados e amostras que exibem um perfil diferenciado de *melting* em relação aos padrões, indicando metilação heterogênea (A) e gráfico diferencial de metilação em que o perfil diferenciado das amostras fica bastante evidente (B).

(A)



(B)



## Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelas bolsas concedidas à Lengert AH, Souza MF e Kuasne H; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa produtividade para Colus IMS; aos médicos urologistas do Hospital do Câncer de Londrina e Hospital Universitário da UEL pelas amostras cedidas e à Ms. Mariana Bisarro dos Reis pelo auxílio com a técnica de MS-HRM.

## Referências

- [1] Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology* 2011;3:51-8.
- [2] Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:687-92.
- [3] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163-7.
- [4] Catto JW, Azzouzi AR, Rehman I, Feeley KM, Cross SS, Amira N, Fromont G, Sibony M, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC. Promoter hypermethylation is associated with tumor location, stage, and subsequent progression in transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005;23:2903-10.
- [5] Chan MW, Chan LW, Tang NLS, Tong JHM, Lo KW, Lee TL, Cheung HY, Wong WS, Chan PSF, Lai FMM, To KF. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:464-70.
- [6] Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 2004;10:1887-93.
- [7] Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, Toma MI, Huland H, Yoo C, Tsai YC, Nichols PW, Bochner BH, Jones PA, Liang G. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10:7457-65.
- [8] Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, Quan C, Kim J, Li QL, Yang JO, Ito Y, Bae SC. *RUNX3* inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors. *Cancer Res* 2005;65:9347-54.
- [9] Wu W, Zhang J, Yang H, Shao Y, Yu B. Examination of *AKAP12* promoter methylation in skin cancer using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Clinical and Experimental Dermatology* 2012;36:381-5.
- [10] Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, Dobrovic A. Sensitive melting analysis after real time methylation specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res* 2008;36:e42.
- [11] Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 2008;3:1903-8.
- [12] Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007;35.
- [13] Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Research Notes* 2008;1:54.

- [14] Lee WH, Isaacs WB, Bova S, Nelson WG. CG Island Methylation Changes Near the *GSTP1* Gene in Prostatic Carcinoma Cells Detected Using the Polymerase Chain Reaction: A New Prostate Cancer Biomarker. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1997;6:443-50.
- [15] Brooks JD, Weinstein M, Lin X, Sun Y, Pin SS, Bova S, Epstein JI, Isaacs WB, Nelson WG. CG Island Methylation Changes Near the *GSTP1* Gene in Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1998;7:531-6.
- [16] Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59:793-7.
- [17] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene *MGMT* and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000;343:1350-4.
- [18] Ogino S, Meyerhardt JA, Kawasaki T, Clark JW, Ryan DP, Kulke MH, Enzinger PC, Wolpin BM, Loda M, Fuchs CS. CpG island methylation, response to combination chemotherapy, and patient survival in advanced microsatellite stable colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2007;450:529-37.
- [19] Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009;22:1519-26.
- [20] Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63.
- [21] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:9821-6.
- [22] Candiloro ILM, Mikeska T, Hokland P, Dobrovic A. Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the *CDKN2B (p15)* gene. *Epigenetics & Chromatin* 2008;1:7.
- [23] Mikeska T, Candiloro ILM, Dobrovic A. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation. *Epigenomics* 2010;2(4):561-573.
- [24] Candiloro ILM, Mikeska T, Dobrovic A. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation. *Epigenetics* 2011;6:500-7.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 do gene *MGMT* localizam-se no mesmo bloco haplotípico e o sítio Ile143Val (rs2308321) pode ser considerado um marcador útil para estudos de associação na população brasileira, podendo ser considerado um tagSNP, assim como já descrito em outras populações do mundo;
- as variantes alélicas dos genes *GSTM1* e *MGMT* não apresentaram associação significativa com câncer de bexiga;
- entre os indivíduos ocupacionalmente expostos a agroquímicos, o polimorfismo do gene *CYP1A1*(rs1048943) e o genótipo nulo do gene *GSTT1* apresentaram associação com a suscetibilidade ao câncer de bexiga;
- entre os indivíduos fumantes, o polimorfismo do gene *GSTP1* (rs1695) e o genótipo nulo do gene *GSTT1* apresentaram associação com a suscetibilidade ao câncer de bexiga;
- o genótipo nulo do gene *GSTT1* demonstrou forte associação positiva com o câncer de bexiga e apresenta potencial como marcador de suscetibilidade;
- nenhuma das variantes alélicas analisadas demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação aos dados histopatológicos dos pacientes, o que indica que os genótipos em questão não influenciam a progressão deste câncer;
- a metilação do gene *GSTP1* não apresentou relação com a tumorigênese da bexiga urinária;
- Foi possível observar metilação heterogênea na região promotora do gene *MGMT* em amostras tumorais e normais. Investigações adicionais ainda são necessárias para quantificar a metilação no gene *MGMT* e verificar seu potencial como biomarcador.

## REFERÊNCIAS

1. Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK. The WHO/The International Society of Urologic Pathology consensus classification of urothelial neoplasms of the urinary bladder. The bladder consensus conference committee. The American Journal of Surgical Pathology. 1998; 22(12):1435-48.
2. INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. 2012. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home/>>. Acesso em: 15 janeiro 2012.
3. Matheus WE. Câncer de Bexiga Pta, Ptis e Pt1. In: Nardozza JA, Zerati FM, Reis RB. *Urologia Fundamental*. São Paulo: Planmark Editora, 2010. cap. 17.
4. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. *Cancer Incidence in Five Continents*, Vol VIII (n. 155). Lyon, France: IARC Publications, 2002.
5. Amling CL. Diagnosis and management of superficial bladder cancer. *Curr Probl Cancer*. 2001; 25(4):219-78.
6. Botteman MF, Pashos CL, Redaelli A, Laskin B, Hauser R. The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. *Pharmacoeconomics*. 2003; 21(18):1315-30.
7. Kim WJ, Bae SK. Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Sci*. 2008; 99(4):646-52.
8. Kirkali Z, Chan T, Manharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemeny L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. Bladder Cancer: Epidemiology, Staging and Grading, and Diagnosis. *Urology*. 2005; 66(Suppl 6A):4-34.
9. Messing EM. Urothelial tumors of the urinary tract. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA., eds. *Campbell's urology*. 8 ed. Philadelphia: Saunders, 2002 p.2732-84.
10. Tiraboschi RB, Dias-Neto JA, Martins ACP, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci Jr S. Fatores de risco em carcinomas de células transicionais da bexiga. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002; 7:20-3.
11. Burch JD, Rohan TE, Howe GR, Risch HA, Hill GB, Steele R, Miller AB. Risk of bladder cancer by source and type of tobacco exposure: A case control study. *International Journal of Cancer*. 1989; 44(4):622-8.
12. Matanoski GM, Elliot EA. Bladder cancer epidemiology. *Epidemiologic Reviews*. 1981; 3:203-29.
13. Matsumoto K, Irie A, Satoh T, Kuruma H, Arakawa T, Baba S. Occupational bladder cancer: from cohort study to biological molecular marker. *Medical Science Monitor*. 2005; 11(10):311-5.

14. Castelao JE, Yuan JM, Skipper PL, Tannenbaum SR, Gago-Dominguez M, Crowder JS, Ross RK, Yu MC. Gender-and smoking - related bladder cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001; 93(7):538-45.
15. Srivastava DSL, Mishra DK, Mandhani A, Mittal B, Kumar A, Mittal RD. Association of Genetic Polymorphism of Glutathione S-transferase M1, T1, P1 and Susceptibility to Bladder Cancer. *European Urology*. 2005; 48(2):339-44.
16. Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*. 2001; 120(1-3):269-80.
17. Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Sugimura H, Trivers GE, Tucker MA, Trump BF, Weston A, Harris CC. Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 1994;3(6):515-8.
18. Antilla S, Luostarinen L, Hirvonen A, Elovaara E, Karjalainen A, Nurminen T, Hayes JD, Vainio H, Ketterer B. Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: Association with GSTM1 polymorphism, smoking and asbestos exposure. *Cancer Research*. 1995; 55(15):3305-9.
19. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Vainio H. The *GSTM1* null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis*. 1993; 14(7):1479-81.
20. Ma Q, Lu AYH. *CYP1A* Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007; 35(7):1009-16.
21. Figueroa JD, Malats N, García-Closas M, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, Chanock S, Welch R, Dosemeci M, Lan Q, Tardon A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Castano-Vinyals G, Rothman N. Bladder cancer risk and genetic variation in *AKR1C3* and other metabolizing genes. *Carcinogenesis*. 2008; 29(10):1955-62.
22. Rushmore TH, Pickett CB. Glutathione S-Transferases, Structure, Regulation, and Therapeutic Implications. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268(16):11475-8.
23. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutation Research*. 2001; 482:21-6.
24. Bernardini S, Bellincampi L, Ballerini S, Federici G, Iori R, Trequattrini A, Ciappi F, Baldinetti F, Bossu P, Caltagirone C, Spalletta G. Glutathione S-Transferase P1 \*C Allelic Variant Increases Susceptibility for Late-Onset Alzheimer Disease: Association Study and Relationship with Apolipoprotein Eε4 Allele. *Clinical Chemistry*. 2006;51(6):944-51.
25. Zeng FF, Liu SY, Wei W, Yao S, Zhu S, Li K, Wan G, Zhang H, Zhong M, Wang B. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Clin Exp Med*. 2010; 10:59-68.
26. Zhang RG, Xu GY, Chen WJ, Zhang WL. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer risk: a meta-analysis of 26 studies. *Mol Biol Rep*. 2011; 38:2491-7.


27. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular Cloning, Characterization, and Expression in *Escherichia coli* of Full-length cDNAs of Three Human Glutathione S-Transferase Pi Gene Variants. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(15):10004–12.
28. Kellen E, Hemelt M, Broberg K, Golka K, Kristensen VN, Hung RJ, Matullo G, Mittal RD, Porru S, Povey A, Schulz WA, Shen J, Buntinx F, Zeegers MP, Taioli E. Pooled Analysis and Meta-analysis of the Glutathione S-Transferase P1 Ile105Val Polymorphism and Bladder Cancer: A HuGE-GSEC Review. *Am J Epidemiol*. 2007; 165:1221-30.
29. Cao W, Cai L, Rao JY, Pantuck A, Lu ML, Dalbagni G, Reuter V, Scher H, Cordon-Cardo C, Figlin RA, Belldgrun A, Zhang ZF. Tobacco Smoking, *GSTP1* Polymorphism, and Bladder Carcinoma. *Cancer*. 2005; 104:2400-8.
30. Altayli E, Gunes S, Yilmaz AF, Goktas S, Bek Y. *CYP1A2*, *CYP2D6*, *GSTM1*, *GSTP1*, and *GSTT1* gene polymorphisms in patients with bladder cancer in a Turkish population. *Int Urol Nephrol*. 2009; 41:259-66.
31. Saad AA, O'Connor PJ, Mostafa MH, Metwalli NE, Cooper DP, Povey AC, Margison GP. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and bladder cancer risk in Egyptians. *Int J Biol Markers*. 2005; 20(1):69-72.
32. Broberg K, Bjork J, Paulsson K, Hoglund M, Albin M. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2005; 26(7):1263-71.
33. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997;18(4):641-4.
34. Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2001; 10(2):125-31.
35. Stern MC, Umbach DM, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair gene *XRCC3* codon 241 polymorphism, its interaction with smoking and *XRCC1* polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2002; 11(9):939-43.
36. Stern MC, Johnson LR, Bell DA, Taylor JA. *XPD* codon 751 polymorphism, metabolism genes, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2002; 11:1004-11.
37. Christmann M, Kaina B. O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): impact on cancer risk in response to tobacco smoke. *Mutat Res*. 2011.
38. Pegg AE, Byers TL. Repair of DNA containing O<sup>6</sup>-alkylguanine. *The FASEB Journal*. 1992; 6:2302-10.
39. Peterson LA, Hecht SS. O6-Methylguanine Is a Critical Determinant of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone Tumorigenesis in A/J Mouse. *Lung Cancer Res*. 1991; 51:5557-64.

40. Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis*. 2000; 21(11):1977-81.
41. Egyházi S, Ma S, Smoczynski K, Hansson J, Platz A, Ringborg U. Novel O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase SNPs: A Frequency Comparison of Patients With Familial Melanoma and Healthy Individuals in Sweden. *Human Mutation*. 2002; 549.
42. Abe M, Inoue R, Suzuki T. A Convenient Method for Genotyping of Human O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase Polymorphism. *Jpn J Human Genet*. 1997; 42:425-8.
43. Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA. Human variants of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA repair*. 2007; 6:1071-8.
44. Gattás GJF, Soares-Vieira JA. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase polymorphisms among caucasians and mulattoes from Brazil. *Occupational Medicine*. 2000; 50:508-11.
45. Hatagima A, Klautau-Guimarães MN, Silva FP, Cabello PH. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genetics and Molecular Biology*. 2000; 23:709-13.
46. Rossit ARB, Cabral IR, Conforti-Froes NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genetics and Molecular Biology*. 1999; 22.
47. D'Arce LPG, Cólus IMS. Cytogenetic and molecular monitoring of brazilian farmers exposed to pesticides. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*. 2000; 20:161-70.
48. Losi-Guembarovski R, D'Arce LPG, Cólus IMS. Glutathione S-transferase Mu (*GSTM1*) null genotype in relation to gender, age, and smoking status in a healthy Brazilian population. *Genetics and Molecular Biology*. 2002; 25:357-60.
49. Conforti-Froes NDT, El-Zein R, Au W. Genetic polymorphism and their contribution to cancer susceptibility. *Cadernos de Saúde Pública*. 1998; 14:7-13.
50. Adorjan P, Distler J, Lipscher E, Model F, Muller J, Pelet C, Braun A, Florl AR, Gutig D, Grabs G, Howe A, Kursar M, Lesche R, Leu E, Lewin A, Maier S, Muller V, Otto T, Scholz C, Schulz WA, Seifer HH, Schwöpe I, Ziebarth H, Berlin K, Piepenbrock C, Olek A. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30.
51. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research*. 1999; 59:793-797.
52. Kwasne H, Rodrigues IS, Fuganti PE, Losi-Guembarovski R, Ito K, Kishima MO, Rodrigues MAF, Rogatto SR, Santos RM, Cólus IMS. Polymorphisms in the AR and PSA Genes as Markers of Susceptibility and Aggressiveness in Prostate Cancer. *Cancer Investigation*. 2010; 28(9):917-24.

53. Kuasne H, Rodrigues IS, Losi-Guembarovski R, Reis MB, Fuganti PE, Gregório EP, Libos Jr. F, Matsuda HM, Rodrigues, MAF, Kishima MO, Cólus IMS. Base excision repair genes XRCC1 and APEX1 and the risk for prostate cancer. *Molecular Biology Reports*. 2010; 1:1-7.
54. Grando JPS, Kuasne H, Losi-Guembarovski R, Rodrigues IS, Matsuda HM, Fuganti PE, Gregorio EP, Libos Jr. F, Menezes RP, Rodrigues MAF, Cólus IMS. Association between polymorphisms in the biometabolism genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in bladder cancer. *Clinical and Experimental Medicine*. 2009; 9:21-28.

## **ANEXOS**

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/Hospital Universitário Regional Norte do Paraná

<b>Parecer de Aprovação Nº 024/10</b> <b>CAAE Nº 0031.0.268.000-10</b> <b>FOLHA DE ROSTO Nº 320706</b>	Londrina, 12 de maio de 2010.
<b>PESQUISADORA: ILCE MARA DE SYLLOS COLUS</b> <b>CCB/DEPTO BIOLOGIA GERAL</b>	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná” (<u>Registro CONEP 268</u>) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p><b>“POLIMORFISMOS GENÉTICOS E MARCADORES EPIGENÉTICOS COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS EM TUMORES UROTELIAIS”</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>APROVADO</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>  <p><b>Prof. Dra. Alexandrina Apãrecida Maciel</b>  <b>Coordenadora</b>  <b>Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</b></p>	

ANEXO B – Autorização do Hospital do Câncer de Londrina para a utilização das amostras dos pacientes do Serviço de Urologia



## DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que o Hospital de Câncer de Londrina autoriza a utilização de amostras dos pacientes do Serviço de Urologia desta instituição, no projeto de pesquisa intitulado “Polimorfismos genéticos e marcadores epigenéticos como marcadores prognósticos em tumores uroteliais”, realizado em parceria com o - Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, sob coordenação da pesquisadora Ilce Mara de Syllos Cólus.

Londrina, 15 de março de 2010.

ANEXO C – Normas da revista *American Journal of Human Biology*, sob as quais o manuscrito 1 foi redigido

**Informed consent:** The AMERICAN JOURNAL OF HUMAN BIOLOGY requires that all appropriate steps be taken in obtaining informed consent of any and all human and/or experimental animal subjects participating in the research comprising the manuscript submitted for review and possible publication. A statement indicating that the protocol and procedures employed was reviewed and approved by the appropriate institutional review committee must be included in the Methods section of the manuscript. For research involving recombinant DNA, containment facilities and guidelines should conform to those of the National Institutes of Health or corresponding institutions. For those investigators who do not have formal ethics review committees, the principles outlined in the Helsinki Declaration should be followed.

**Disclosure statement:** All authors must disclose any affiliations that they consider to be relevant and important with any organization that to any author's knowledge has a direct interest, particularly a financial interest, in the subject matter or materials discussed. Such affiliations include, but are not limited to, employment by an industrial concern, ownership of stock, membership on a standing advisory council or committee, a seat on the board of directors, or being publicly associated with a company or its products. Other areas of real or perceived conflict of interest would include receiving honoraria or consulting fees or receiving grants or funds from such corporations or individuals representing such corporations. The simplest remedy for conflict of interest is disclosure. In the Journal, disclosure will henceforth be achieved by the inclusion of a short footnote with each published article.

**Conflict of Interest:** The AMERICAN JOURNAL OF HUMAN BIOLOGY requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter (if applicable) to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the footnotes, Conflict of Interest or Acknowledgments section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

### **Manuscripts**

Research reports, both Short Reports and Original Research Articles, should have a uniform style and be submitted exactly as they are to appear in print. A manuscript should consist of the following subdivisions, each beginning on a separate page:

- Title page
- Abstract and keywords
- Text
- Literature cited

- Footnotes, if any
- Tables (may be sent as a separate file if necessary)
- Figure legends
- The spelling of nontechnical terms should be as recommended in the current Webster's International Dictionary.
- Always spell out numbers when they stand as the first word in a sentence; do not follow such numbers with abbreviations. Numbers indicating time, weight, and measurements are to be in Arabic numerals when followed by abbreviations (eg, 2 mm; 1 sec; 3 ml).

**Title page.** The title page must contain the following.

- Title
- Author's name (or names)
- Institution and department from which the paper emanated, with city, state, and zip codes
- Abbreviated title (running headline) not to exceed 48 characters and spaces
- Name, address, telephone and fax number, and e-mail address of the person to whom the proof is to be sent
- All grant information including corresponding grant numbers.
- **Abstract.** The abstract should consist of 250 words or fewer. When published, it will precede the introductory section of the text. The abstract should be written in complete sentences and should include the following sections with section heads in bold followed by a colon.
  - **Objectives:** A succinct statement of the goal(s) of the research.
  - **Methods:** A brief description of the study design, materials, subjects, data collection and statistical or other analysis methods used.
  - **Results:** A brief description of the principal findings.
  - **Conclusions:** A brief statement of the conclusions drawn relative to the objectives of the study.

This structure can be waived for Feature Articles and certain other articles at the discretion of the Editor.

**Key Words.** Authors should supply 4 to 6 key words, terms, or brief phrases that will aid in identifying the article to electronic search engines and in indexing the content of the article.

### Literature Cited

In the text, references to the literature should be cited by author's surname followed by year of publication. If more than two authors, use only lead author and "et al.":

... studies by Madrigal (1994) reveal ...  
 ... studies by Winkler and Kirchengast (1994) reveal ...  
 ... studies by Spurgeon et al. (1994) reveal ...  
 ... an earlier report (Smith, 1994) ...  
 ... earlier reports (Leonard and Robertson, 1994; Malina and Reyes, 1994) ...

When references are made to more than one paper by the same author published in the same year, they should be designated in the text as (Lampl, 1993a,b) and in the literature list as follows.

Personal communications and submitted manuscripts should be listed as unpublished communications in the text and not listed in the "Literature Cited" section.

Lampl M. 1993a. Introduction: human growth patterns. *Am J Hum Biol* 5:601–602.

Lampl M. 1993b. Evidence of saltatory growth in infancy. *Am J Hum Biol* 5:641–652.

The literature list must be arranged alphabetically, not chronologically, by author's or authors' surname(s) in the following style: Author's name (or names), year of publication, complete title, volume, and inclusive pages as follows:

**Journal Article:**

Madrigal L. 1994. Twinning rates in admixed Costa Rican populations. *Am J Hum Biol* 6:215–218.

**Book:**

Felber JP, Acheson KJ, Tappy L. 1993. From obesity to diabetes. New York: John Wiley & Sons, Inc. 508 p.

**Book Chapter:**

McClain C, Stuart M, Kasarskis E, Humphries L. 1993. Zinc, appetite regulation, and eating disorders. In: Prasad AS, editor. *Essential and toxic trace elements in human health and disease: an update*. New York: Wiley-Liss. p 47–64.

Abbreviations of journal titles should follow those used in *Index Medicus*.

**Footnotes.** Footnotes to the text are discouraged. Footnotes to a table should be typed directly beneath the table and numbered with superscripts (1, 2, 3, etc.). They should not be numbered in sequence with the footnotes in the text. Also, if superscript numbers could be mistaken for exponents, substitute superscript a, b, c, etc.

**Tables.** All tables must be cited in the text. Since tabular material is expensive to reproduce, it should be simple and uncomplicated, with as few vertical and horizontal rules as possible. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented in footnotes.

**Figures.** All figures must be cited in the text. Figure legends are to be numbered consecutively as follows: Fig. 1. . . . , Fig. 2. . . . , and should follow the sequence of reference in the text. Type double-spaced.

Abbreviations for all figures should be listed alphabetically and placed before the first figure mentioning them.

**Abbreviations**

AChE Acetylcholinesterase

CP Cortical plate

SmI Primary somatosensory cortex

V Ventral

Group figures to fit a single page along with their appropriate legends. Reference to relevant text passages can often reduce the length of legends and avoid redundancy.

**Metric system.** The metric system should be used for all measurements, weights, etc. Temperatures should be expressed in degrees Celsius (centigrade). Metric abbreviations should be expressed in lowercase without periods.

**Symbols.** When preceded by a digit, the following symbols are to be used: % for percent; ° for degree.

### **Illustrations**

Electronic versions of illustrations are preferred for the review process; they must be saved in .tif or .eps format.

Authors should bear in mind the final size of illustrations in printed form and be sure that appropriate font sizes, line thicknesses, etc. are used for legibility.

- Lettering and labels must be readable after reduction. When reduced, the minimum height of a capital letter should not be less than 2.5 mm for a photomicrograph and 1 mm for a graph or chart.
- When printed, an individual figure or group of figures should not exceed the dimensions of 5½" (14.0 cm) wide by 7¾" (19.7 cm) long or 2 5/8" (6.7 cm) wide by 7¾" (19.7 cm) long in the case of single-column placement.

### **Miscellaneous**

Upon acceptance of an article for publication, the author will be asked to sign a copyright transfer agreement, transferring rights to the publisher, who reserves copyright.

**Proofs.** A single set of page and illustration proofs will be sent to the author. All corrections should be marked clearly, directly on page proofs.

**Reprints.** Reprints may be ordered at <https://caesar.sheridan.com/reprints/redirect.php?pub=10089&acro=AJHB>.

**Numbering.** Figures, including charts and graphs, must be numbered consecutively.

ANEXO D – Normas da revista *Cancer Investigation*, sob as quais o manuscrito 2 foi redigido

### **General Guidelines**

Please write clearly and concisely, stating your objectives clearly and defining your terms. Your arguments should be substantiated with well-reasoned supporting evidence. In writing your paper, you are encouraged to review articles in the area you are addressing which have been previously published in the Journal, and where you feel appropriate, to reference them. This will enhance context, coherence, and continuity for our readers. Authors should include telephone and fax numbers as well as e-mail addresses on the cover page of manuscripts. Articles should be written in English. Authors whose native language is not English are requested to have their manuscript checked for linguistic correctness before submission. Submissions should include, where appropriate, a formal statement that ethical consent for the work to be carried out has been given.

### **Ethical Review**

The Journal supports the principles of the Declaration of Helsinki, and expect that the authors of papers submitted to the Journal will have obtained ethical consent and followed those legal and regulatory requirements for human experimentation with drugs, including informed consent, according to procedures which apply in their institution and country. The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) represents a minimal requirement. Please click on Ethics and Consent for further information.

### **Preparation of Manuscripts**

All parts of the manuscript should be typewritten, double-spaced, with margins of at least one inch on all sides. Number manuscript pages consecutively throughout the paper. Charts and tables are considered textual and should also be supplied in a format compatible with Microsoft Word. All figures (illustrations, diagrams, photographs) should be supplied in JPG or TIFF format. Do not save your files as "text only" or "read only".

### **Structure of Manuscripts**

In general, manuscripts should be divided into sections with the headings: Title page, Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Declaration of Interest statement, References, Tables and Figures. Each section should begin on a new sheet and be identified with the shoulder heading. Other sub-section headings within the main headings may be used but should be limited.

### **Title Page**

A title page should be provided comprising the article title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. A short running title not exceeding 50 character spaces should also be included on the title page.

### **Abstract**

Each article should be summarized in an abstract of not more than 100 words. Avoid abbreviations, diagrams, and reference to the text in the abstract.

## **Text**

This should in general, but not necessarily, be divided into sections with the headings: Introduction, Material and Methods, Results, Discussion.

## **Style**

Abbreviations and symbols must be standard and SI units used throughout. Statistical analyses must explain the methods used. The use of footnotes is not permitted. Single quotation marks should be used. The Editor reserves the right to alter manuscripts whenever necessary to make them conform to the stylistic and bibliographic conventions of the journal.

## **Acknowledgments and Declaration of Interests**

Acknowledgments and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgments section details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here. Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable.

### **Acknowledgments section**

Any acknowledgments authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes.

### **Declaration of Interest section**

All declarations of interest must be outlined under the subheading “Declaration of interest”. If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: The authors report no declarations of interest. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the “Declaration of interest” field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission. Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement.

## **References**

Please cite references in the text by number only; superscript and enclosed in brackets. At the end of the article, list the references in the order they appear in the text. Examples:

**Journal:** 1. Goetz, M.P.; Toft, D.O.; Ames, M.M.; Erlichman, C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 2003, 14, 1169–1176.

**Book:** 2. Grimm, P.; Blasko, J.; Sylvester, J. *The Prostate Cancer Treatment Book*; McGraw, Hill: New York, 2004.

**Tables and figures should be referred to in text as follows:** Figure 1, Figure 2; Table 1, Table 2. The place at which a table or figure is to be inserted in the printed text should be indicated clearly on the manuscript. Each table and/or figure must have a legend that explains its purpose without reference to the text. Each table and/or figure must be uploaded separately from the main document. Charts and tables are considered textual and should also be supplied in a format compatible with Microsoft Word.

**Tables:** should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. A

short descriptive title should appear above each table with a clear legend and any footnotes suitably identified below. All units must be included.

**Figures:** All illustrations (including photographs, graphs and diagrams) should be referred to as Figures and their position indicated in the text (e.g., Figure 3). All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper. In multi-part figures, each part should be labelled (e.g. figure 1(a), figure 1(b)). The captions of all figures should be submitted on a separate sheet, should include keys to symbols, and should make interpretation possible without reference to the text. Figures should ideally be professionally drawn and designed with the format of the journal in mind and should be capable of reduction. Files should be saved as one of the following formats: TIFF (tagged image file format), JPG, PostScript or EPS (encapsulated PostScript), and should contain all the necessary font information and the source file of the application (e.g. CorelDraw/Mac, CorelDraw/PC).

**Color Figures:** Avoid the use of color and tints for purely aesthetic reasons. Any figure submitted as a color original will appear in color in the journal's online edition free of charge and can be downloaded. Paper copy color reproduction will only be considered on condition that authors contribute to the associated costs. Charges are: US\$500 per article, a 15% service fee will be applied by Rights link. (Color costs will be waived for invited articles).

ANEXO E – Normas da revista *Urologic Oncology – Seminars and Original Investigation*, sob as quais o manuscrito 3 foi redigido

- 1) **Manuscripts** should be submitted double-spaced. They should have a face sheet upon which are recorded the title of the work, all of the authors' names with degrees, institutional affiliations, complete mailing address, phone, fax, and e-mail address for the individual to whom correspondence should be directed and for all of the authors as listed.
- 2) A **summary**, not to exceed 350 words, should include objectives, methods and materials, results and conclusions. Acknowledgments, tabular material, figure legends, and references should be submitted separately. Authors **must** submit up to six keywords with the manuscript.
- 3) All **tables** should be submitted separately, be numbered with Arabic numerals and have descriptive titles.
- 4) All **figures** should be submitted separately and be numbered consecutively with Arabic numerals. Figures should be accompanied by legends, also submitted separately, which should include descriptive titles and, if needed, an explanation of what the figure represents.
- 5) All **illustrations** must be submitted online. For line artwork, black-ink drawings must be of professional quality. Radiologic images must be of sufficient quality and clarity to allow ready visualization of the finding(s) being described, with appropriate labelling as indicated. Color illustrations will be printed at the author's expense. Once a manuscript is accepted for publication, the publisher will provide a quote for such costs. However, any artwork submitted in color will automatically appear in color in the online version of the article, free of charge, even if you choose to have it appear in black and white in the print version. When you submit your article, please indicate on each color figure your preference for color reproduction in print (for a fee) or color online-only (free of charge).
- 6) **Footnotes** to the text should be numbered consecutively with superior Arabic numerals.
- 7) **Approval by the Institutional Internal Review Board** for animal and/or clinical studies must be stated in the Methods and Materials section. These requirements should be consistent with the rules of the country of origin.
- 8) **References.** List all authors when six or fewer; when seven or more, list the first three and add et al. Authors are responsible for completeness and accuracy of all references. Citation in the text is by number in brackets (i.e., [1]), corresponding to the numbered reference list at the end of the article. Periodical abbreviations should follow those given by Index Medicus. References should be styled as follows:

*Journal*

Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:1425-38.

*Book*

Katz DH. Lymphocyte differentiation, recognition and regulation. New York: Academic Press, 1977.

*Chapter in a book*

Ceppellini R, Curtoni ES, Mattiuz PL, Miggiano V, Scudeller G, Serra A. Genetics of leukocyte antigens: A family study of segregation and linkage. In: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi RM, editors. *Histocompatibility*. Copenhagen: Munksgaard, 1967. pp. 189-202.

- 9) The **system** used for tumor classification must be referenced with TNM terminology. Acronyms and other abbreviations should be first defined and then remain consistent throughout the manuscript. Generic names should be followed by the correct chemical name when first used; trade names should not be used. Normal values should be given for all laboratory studies that are unique, vary according to the technique used (the technique should also be mentioned) or are important in interpreting results and drawing conclusions.
- 10) **Conflict of interest.** A statement concerning any financial relationship or conflict of interest between any of the authors and the subject matter should be submitted.

**Delay** in review can be avoided if authors not familiar with the English language acquire the assistance of an expert for review prior to submission.

**Revised manuscripts.** Revised manuscripts should be returned to the Editorial Office online **within 60 days of receiving notice** that revision is suggested, along with a detailed letter describing the changes made or arguments for opposing changes suggested by the reviewers. Failure to submit a revised manuscript by the 60-day deadline will result in the manuscript being automatically withdrawn from the resubmission process. Submission of a revised manuscript will then require review as a new manuscript.

**Copyright.** Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information under U.S. Copyright Law.

**Proofs and reprints.** The corresponding author will receive proofs online, which should be corrected and returned **within 48 hours** of receipt. Proofs must be carefully checked by the authors, as it is their responsibility to see that all errors are corrected and queries from editors answered. To order reprints use the order form and price list accompanying the proofs.