

Análise do padrão de metilação dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* no carcinoma colorretal.

Autor: Rúbia Denise Ruppenthal

Orientador: Cláudio Osmar Pereira Alexandre

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Análise do padrão de metilação dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* no carcinoma colorretal.

**Autor: Rúbia Denise Ruppenthal
Orientador: Cláudio Osmar Pereira Alexandre**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Ruppenthal, Rúbia Denise.

Análise do padrão de metilação dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* no carcinoma colorretal [manuscrito] / por Rúbia Denise Ruppenthal. 2009. 99 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Pós-graduação em Patologia. 2009.

"Orientação: Profº Dr. Cláudio Osmar Pereira Alexandre"

1. Câncer colorretal. 2. Carcinoma colorretal. 3. Hipermetilação do DNA. 4. *CDX1*. 5. *GSTP1*. I. Título. II. Alexandre, Cláudio Osmar Pereira.

CDD 616.99435

CDU 616.351-006.04

Bibliotecária Responsável
Gilmara Freitas Gomes CRB-10/1367

À quem me ensinou o valor do amor... pai e mãe
e à pessoa que me fez entendê-lo de fato,

Abi.

“A vida é um incêndio: nela dançamos, salamandras mágicas.
Que importa restarem cinzas,
se a chama foi bela e alta?”

Mário Quintana

Agradecimentos

Agradeço, de forma especial e primeira, à **Deus**, que me ampara, protege e guia;
Ao Prof^o Dr. Cláudio Osmar Pereira Alexandre pela orientação e pela excelente oportunidade de crescimento profissional;

Ao Dr. Daniel Damin pela cedência do material biológico e pela revisão aprofundada dos manuscritos;

Ao Dr. Antônio Fabiano Ferreira Filho, pelo apoio e pela ajuda incansável na análise dos dados e na orientação dos aspectos clínicos relevantes a serem discutidos;

À biomédica Carmela Nicolini, “meu braço direito” que, com seu entusiasmo e eficiência, contribuiu tanto na realização dos experimentos e hoje segue os passos da pesquisa em metilação dentro do laboratório;

À Dra. Adriana Roehe e à MSc. Rosalva Meurer pela ajuda na análise imunoistoquímica e na interpretação dos resultados;

Como instituição, à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/UFRGS);

À todos os *professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia* por toda a dedicação;

Aos colegas do Lab. de Biologia Molecular da UFCSPA que tornaram tudo mais fácil e divertido...*Andréa, Grasiela, Magda, Lu, Juci, Ananda, Lila, Lise, Lucas...*

Ao *Centro Universitário Metodista do IPA* pelo incentivo à formação continuada de seus docentes e pela liberação para a realização das disciplinas;

Aos meus colegas, *docentes do IPA*, que tornam a minha vida lá uma delícia. Em especial a *Patrícia Bock*, por sempre me dar força e apoio sincero e verdadeiro;

Aos *meus alunos do IPA*, que tanto me ensinam diariamente, em especial, à *Ana Paula Fernandes* e *Vanessa Schneider* que acompanharam de perto o andamento deste trabalho;

Às minhas amigas de todas as horas *Adriana, Cecília, Vânia e Christyanne*, a quem todas as palavras de agradecimento não bastam, e com quem, há anos, venho partilhando tudo;

Aos meus “pequenos amores” *João Pedro, Amália, Ana Clara e Lucas...*

À *minha família*, suporte para tudo...*pai, mãe, Carla, Gustavo, Amalinha, Márcia, Ricardo, João, Ana, Lísias* e...de forma MUITO especial, agradeço o apoio diário, a compreensão, o auxílio e as claras demonstrações de amor de meu marido, *Ábner*.

Sumário

Folha de rosto.....	I
Dedicatória.....	II
Agradecimentos.....	IV
Sumário.....	V
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
 <i>CAPÍTULO 1</i>	
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DA LITERATURA.....	2
O carcinoma colorretal (CCR).....	2
A influência da epigenética sobre o desenvolvimento do CCR.....	7
A hipermetilação e o carcinoma colorretal.....	14
Implicações da hipermetilação do DNA no diagnóstico, prognóstico e tratamento.....	16
Alterações no padrão de metilação dos genes <i>CDX1</i> , <i>GSTP1</i> e <i>TWIST1</i>	20
Gene <i>CDX1</i>	20
Gene <i>GSTP1</i>	23
Gene <i>TWIST1</i>	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
OBJETIVOS.....	37
Geral.....	37
Específicos.....	37
 <i>CAPÍTULO 2</i>	
Artigo Original. <i>TWIST1 Promoter Methylation in Primary Colorectal Cancer</i>	38
 <i>CAPÍTULO 3</i>	
Carta (Letter to Editor). <i>TWIST1 Methylation and Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer</i>	57
 <i>CAPÍTULO 4</i>	
Artigo Original. <i>CpG island hypermethylation of CDX1 and GSTP1 as a marker in diagnosis and prognosis of colorectal cancer</i>	61

CONCLUSÕES FINAIS.....	78
ANEXOS.....	80
Anexo 1. Detalhamento de resultados não-incluídos nos manuscritos.....	80
Anexo 2. Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).....	87
Anexo 3. Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).....	88
Anexo 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	89
Anexo 5. Participação em eventos e apresentações resultantes deste trabalho.....	90

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Vias moleculares da carcinogênese colorretal.....	6
Tabela 2. Possíveis conseqüências das modificações do perfil de metilação sobre as vantagens de crescimento seletivas que contribuem na carcinogênese.....	11
Tabela 3. Frequência de hipermetilação dos genes <i>CDX1</i> , <i>GSTP1</i> e <i>TWIST1</i> em diferentes neoplasias.....	21
Tabela 4. Avaliação da frequência de metilação de <i>GSTP1</i> em diferentes estudos envolvendo pacientes com e sem CCR.....	24

CAPÍTULO 2

Table 1. Association of <i>TWIST1</i> hypermethylation status and main clinicopathological features in 73 CRC patients.....	55
Table 2. Impact of clinicopathological parameters and <i>TWIST1</i> hypermethylation on overall and disease-free survival in patients with CRC.....	56

CAPÍTULO 4

Table 1. Association of <i>CDX1</i> and <i>GSTP1</i> hypermethylation status and main clinicopathological features in 73 CRC patients.....	76
Table 2. Impact of clinicopathological parameters and <i>CDX1</i> and <i>GSTP1</i> hypermethylation on overall and disease-free survival in patients with CRC.....	77

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mecanismo de metilação do DNA.....	9
Figura 2. Silenciamento de genes através da hipermetilação.....	12

CAPÍTULO 2

Figure 1. MSP analysis of <i>TWIST1</i> hypermethylation in colorectal cancer tissue (CRC), in paired normal-appearing mucosa (NAM) and in nontumoral mucosa (controls).....	54
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO 4

Figure 1. MSP analysis of <i>CDX1</i> and <i>GSTP1</i> hypermethylation in colorectal cancer tissue (CRC) and paired normal-appearing mucosa (NAM) from CRC patients and nontumoral mucosa from patients without CRC (controls)	75
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Lista de abreviaturas

5-aza-dC: 5-aza-2-deoxicitidina
AJCC: American Joint Cancer Committee
CCR: carcinoma colorretal
CEA: antígeno carcinoembrionário
CIMP: fenótipo metilador de ilhas CpG
CIN: instabilidade cromossômica
CpG: citosina-fosfato-guanina
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNMT: DNA metiltransferase
FAP: síndrome polipose adenomatosa familiar
HBV: vírus da hepatite B
HDAC: histona desacetilase
HMT: histona metiltransferase
HNPCC: síndrome do câncer colorretal não-polipose hereditária
ICF: Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies
MBP: methyl-CpG binding domain protein
Metil-THF: metil tetraidrofolato
MSI: instabilidade de microssatélites
PCR/LDR: multiplex polymerase chain reaction/ligase detection reaction
SAHA: ácido suberoilanalida hidroxâmico
SAM: S-adenosilmetionina
TNM: tumor-linfonodo-metástase (classificação)
UICC: Union Internationale Controle Cancer
C/EBP alpha: CCAAT/enhancer-binding protein alpha
PPAR-gamma: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma protein

Genes – nomenclatura oficial

APC: adenomatous polyposis coli
BRCA1: breast cancer 1
CACNA1G: calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
CDH1: cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)
CDKN2B: cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)
CDX1: caudal type homeobox 1
DAPK1: death-associated protein kinase 1
DDC: dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)
FMR1: fragile X mental retardation 1
GSTP1: glutathione S-transferase pi 1
HIF1 α : hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
HP1: chromobox homolog 5 (HP1 alpha homolog, Drosophila)
HRAS: v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IGF2: insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
MGMT: O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MLH1: mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
MSH2: mutS homolog 2, colon cancer
MSH6: mutS homolog 6
NEUROG1: neurogenin 1
PMS1: PMS1 postmeiotic segregation increased 1
PMS2: PMS2 postmeiotic segregation increased 2
PTGS2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
RB1: retinoblastoma 1
RUNX3: runt-related transcription factor 3
SMAD2: SMAD family member 2
SMAD4: SMAD family member 4
SOCS1: suppressor of cytokine signaling 1
THBS1: thrombospondin 1
TIMP3: TIMP metalloproteinase inhibitor 3
TP53: tumor protein p53
TWIST1: twist homolog 1 (Drosophila)
VHL: von Hippel-Lindau tumor suppressor

CAPÍTULO 1

Revisão da literatura e objetivos

1. INTRODUÇÃO

As alterações epigenéticas, modificações no genoma herdáveis via mitose e/ou meiose que resultam na alteração da expressão de genes sem afetar diretamente a seqüência de DNA, têm sido amplamente relacionadas ao desenvolvimento de vários tipos de neoplasias (Miyamoto e Ushijima, 2005). A hipermetilação, a mais conhecida das alterações epigenéticas, é representada pela metilação anormal de nucleotídeos citosina em sítios CpG dentro de regiões conhecidas como ilhas CpG (Gardiner-Garden e Frommer, 1987). A hipermetilação específica de alguns destes sítios nos promotores pode afetar diretamente a expressão gênica tanto em processos fisiológicos, como a inativação do cromossomo X (Jaenisch e Bird, 2003) como patológicos, como as neoplasias (Issa, 2000). Foi demonstrado que genes que regulam processos celulares importantes, como o controle do ciclo celular (*RB1*, *CDK2A*, *CDK2B*), o reparo do DNA (*MGMT*, *MLH1*, *BRCA1*), a apoptose (*DAPK*) e a metastização (*CDH1*, *TIMP3*) [Jones e Baylin, 2002; Esteller e Herman, 2002] são regulados via metilação. Em função disso, o papel deste mecanismo de controle transcricional tem sido investigado em uma grande variedade de tumores (Brena e Costello, 2007).

O desenvolvimento do carcinoma colorretal (CCR) e os seus distintos estágios morfológicos estão relacionados a várias alterações genéticas e epigenéticas (Lind *et al.*, 2004). O número de genes investigados quanto à metilação vem crescendo, como também a correlação entre os achados e as características clinicopatológicas dos pacientes envolvidos (Frigola *et al.*, 2005; Teodoridis *et al.*, 2008). Sua detecção pode ser útil no diagnóstico, prognóstico e prevenção de diversos tipos de câncer, assim como no desenvolvimento de drogas que as revertam e freiem o seu desenvolvimento (Kopelovich *et al.*, 2003).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O carcinoma colorretal (CCR)

O CCR, tumor maligno que acomete o cólon e o reto, é o segundo tipo de câncer mais prevalente no mundo, com uma estimativa de 2,4 milhões de pessoas vivas com diagnóstico de CCR nos últimos cinco anos (Nystrom e Mutanen, 2009). A grande maioria (98%) de todas as neoplasias malignas do intestino grosso é do tipo adenocarcinoma, que surge quase sempre a partir de pólipos adenomatosos (Jass *et al.*, 2002). O CCR pode ainda ser subclassificado em esporádico ou hereditário, este último incluindo, dentre outras, a síndrome polipose adenomatosa familiar (FAP) e a síndrome do câncer colorretal não-polipose hereditária (HNPCC), ambas com aspectos moleculares e clinicopatológicos bem definidos (Leslie *et al.*, 2002; Peltomäki, 2001).

O CCR apresenta incidência variável nos diferentes países, predominando naqueles economicamente mais desenvolvidos, como os Estados Unidos, a Nova Zelândia e Austrália. Incidências menores são registradas na América do Sul, sudoeste da Ásia, África Equatorial e Índia (Nystrom e Mutanen, 2009). No Brasil, figura entre os cinco primeiros cânceres mais frequentes e a incidência não é homogênea em todo o país, com prevalência elevada nas Regiões Sul e Sudeste, particularmente nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro. O risco estimado é de 13 casos novos a cada 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres. Como nota-se, a distribuição entre os sexos não é homogênea, sendo que o CCR ocupa da 4^a à 6^a posição entre os homens e da 3^a à 5^a posição entre as mulheres, dependendo da região do país avaliada. Em relação à idade, mais de 50% dos casos manifestam-se em indivíduos com mais de 60 anos (média de 67 anos), sendo o risco deste câncer maior quanto maior for a faixa etária (risco de 0,05 até 39

anos e 4,3 entre 60 a 80 anos) [Brasil. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer; 2007].

O Rio Grande do Sul é o estado do Brasil que lidera em números de novos casos de CCR em ambos os sexos. A taxa bruta de novos casos estimada para 2008 foi a mais elevada do país, sendo de 26,35/100.000 homens no Estado e de 43,47/100.000 homens em Porto Alegre. Entre as mulheres, esta a taxa bruta é de 28,22 (RS) e de 44,97 (Porto Alegre) para cada 100.000 mulheres (Brasil. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer; 2007)

Em relação à mortalidade, no Brasil o CCR representa a quinta posição entre as causas de óbitos mais freqüentes para ambos os sexos. De acordo com o Ministério da Saúde (2008), este tipo de tumor é responsável por 13,4% da mortalidade para todas as idades e por 21% para a faixa entre 60 e 64 anos. Todas as regiões do Brasil apresentaram tendência de aumento nas taxas de mortalidade durante o período de 1979 à 2005. Na análise da série histórica dos índices de mortalidade para o período compreendido entre 1979 e 2005, houve crescimento médio anual de 3,5%. (DATASUS – Ministério da Saúde, 2009).

De acordo com a estimativa de risco para o CCR, as populações são atualmente classificadas conforme segue: (1) *população de baixo risco*, pacientes com idade inferior a 50 anos e sem outros fatores de risco para CCR; (2) *população de risco moderado*, pacientes com história familiar de CCR em um ou mais parentes de primeiro grau, história pessoal de pólipos maior do que 1 cm ou múltiplos pólipos de qualquer tamanho e indivíduos com antecedente pessoal de CCR tratado com intenção curativa; e (3) *população de alto risco*, indivíduos com história familiar de CCR hereditário na forma de FAP ou HNPCC, ou com diagnóstico de doença inflamatória intestinal na forma de pancolite ou colite esquerda (Habr-Gama, 2005).

O protocolo-padrão de rastreamento do CCR na população de risco baixo e moderado mais utilizado atualmente no Brasil é a realização anual de pesquisa de sangue nas fezes, seguida pela colonoscopia ou retossigmoidoscopia nos indivíduos com resultado positivo. A polipectomia endoscópica reduz a incidência do CCR em 90% e de morte em até 100%. Recomenda-se que este seja o primeiro exame a ser feito nos indivíduos de alto risco para o câncer a partir do 40 anos e como rotina nos de risco moderado, portadores de resultados positivos de pesquisa de sangue nas fezes (Winawer *et al.*, 2003).

O indicador prognóstico isolado mais importante do CCR é a extensão (estadio) do tumor no momento do diagnóstico. Em 2001, a Associação Médica Brasileira e o Conselho Federal de Medicina, através de um documento intitulado *Diretrizes de Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Carcinoma Colorretal*, sugeriram a utilização da classificação tumor-linfonodo-metástase (TNM) e de Dukes e/ou Astler-Coller para a padronização no Brasil do estadiamento pós-operatório completo do CCR segundo critérios internacionalmente utilizados. De acordo com o estadio tumoral observado no momento do diagnóstico, o tratamento cirúrgico passa a ter intenção curativa ou paliativa (Cordeiro *et al.*, 2001).

Atualmente, acredita-se que o CCR se desenvolva a partir de duas vias patogenticamente diferentes (Tabela 1). A primeira via, denominada de seqüência *adenoma-carcinoma*, via *APC/Catenina* ou via da *instabilidade cromossômica (CIN)*, é responsável por 80% dos tumores esporádicos (Fearon e Vogelstein, 1990). Caracteriza-se por elevada instabilidade cromossômica associada ao acúmulo gradual de mutações em um número de oncogenes e genes supressores tumorais. Dentre as alterações genéticas observadas estão a perda dos genes supressores de

tumor *APC* e *TP53*, a mutação do gene *HRAS* e a deleção 18q21 (genes *DDC*, *SMAD2* e *SMAD4*) [Leslie *et al.*, 2002]. A segunda via, denominada *via de reparo de emparelhamento errôneo ou instabilidade de microssatélites (MSI)*, está envolvida em somente 10 a 15% dos tumores esporádicos e com mutações em diferentes genes responsáveis pelo reparo de danos ao DNA (como *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS1* e *PMS2*) [Peltomäki, 2001]. Vale lembrar, no entanto, que nenhuma das alterações listadas nestas duas vias aparece universalmente. Por exemplo, defeitos em *APC* são universais nos pólipos associados à FAP, contudo, variam enormemente nos pólipos displásicos associados ao câncer colorretal esporádico [Wynter *et al.*, 2004], o que sugere que existam mecanismos complementares (genéticos ou epigenéticos) que possam contribuir substancialmente na carcinogênese do CCR ainda não elucidados.

As observações histológicas e genéticas feitas no CCR demonstraram que este é um tipo de tumor que se desenvolve através de um processo em múltiplas etapas (Jones e Baylin, 2002). De acordo com este modelo, o CCR se desenvolve a partir do epitélio normal do cólon, passando por um estágio de crescimento hiperplásico (*crypt foci*), por lesões precursoras benignas (adenomas ou pólipos serrateis) até estágios avançados de adenoma, e finalmente o carcinoma. Estudos realizados nos últimos 15 anos revelaram que alterações genéticas, e notavelmente, epigenéticas são acumuladas durante o desenvolvimento seqüencial do CCR (Baylin, 2006, Young), e por isso este tumor é hoje utilizado como modelo para estudos sobre a contribuição destas alterações na carcinogênese em humanos.

Tabela 1

Vias moleculares da carcinogênese colorretal.

Via molecular	Carcinoma colorretal hereditário			Carcinoma colorretal esporádico		
	Fenótipo clínico	Histopatologia	Genética	Fenótipo clínico	Histopatologia	Genética
Seqüência adenoma-carcinoma	Polipose adenomatosa familiar (FAP)	Inúmeros pólipos adenomatosos Adenocarcinomas moderadamente diferenciados	Inativação da linhagem germinativa do <i>APC</i>	Tumores malignos predominantemente do lado esquerdo	Adenomas tubulares, tubovilosos e vilosos Adenocarcinomas moderadamente diferenciados	Inativação somática ou mutação de múltiplos genes
Instabilidade de microssatélites	Câncer colorretal não-polipose hereditário (HNPCC)	Carcinoma mucinoso e pouco diferenciados com infiltrado linfocitário	Inativação da linhagem germinativa dos genes de reparo <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	Tumores malignos predominantemente do lado direito	Não há lesões precursoras Adenomas serrilhados sésseis Pólipos hiperplásicos grandes Carcinoma mucinoso	Inativação somática dos genes de reparo <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>

[Fearon e Vogelstein, 1990, Leslie *et al.*, 2002; Peltomäki, 2001].

2.2 A influência da epigenética sobre o desenvolvimento do CCR.

As anormalidades celulares de natureza genética e epigenética têm sido apontadas como mecanismos complementares e que interagem entre si no processo de tumorigênese (Szyf, 2006). As alterações genéticas, como mutações de ponto, translocações, instabilidade cromossomal (CIN) e de microssatélites (MSI), deleções e ampliações gênicas têm sido classicamente relacionadas tanto à gênese como à plasticidade tumoral, como invasividade, metastização e resistência a drogas (Bodmer, 2006). No entanto, a epigenética, termo que compreende mecanismos herdáveis através de divisão celular que não alteram a seqüência do DNA, tem sido considerada uma alternativa às mutações e alterações cromossomais por afetar diretamente a transcrição de genes relacionados à carcinogênese. Vários estudos que visam integrar as contribuições do 'genoma' e do 'epigenoma' na iniciação e evolução tumoral são hoje disponíveis (Brena e Costello, 2007, Feinberg *et al.*, 2006).

Três mecanismos bioquímicos são classicamente referidos como epigenéticos: (I) a metilação de DNA, (II) a modificação de histonas e (III) ligação ao DNA de proteínas não-histona como as pertencentes ao complexo Polycomb-tritorax (Lande-Diner e Cedar, 2005). Estes dois últimos mecanismos estão relacionados à modificação na estrutura da cromatina e por isso sugere-se que sejam utilizados de forma coordenada na desativação e reativação de genes durante as diferentes etapas da diferenciação celular (Bock e Lengauer, 2008).

Atualmente, a metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais amplamente estudado, principalmente devido ao desenvolvimento de tecnologias que permitiram a sua investigação em diferentes tecidos de forma simplificada. A

metilação do DNA geralmente ocorre em sequências curtas de DNA nas quais a frequência de citosinas (C) e guaninas (G) é elevada quando comparada a outras regiões do genoma, as chamadas 'ilhas CpG' ('p' indica que "C" e "G" estão ligados por uma ligação fosfodiéster) [Strathdee e Brown, 2002].

Quimicamente, a metilação do DNA consiste na produção de uma molécula de 5-metilcitosina através da ação da enzima DNA-metiltransferase (DNMT 1, 3a ou 3b). Esta enzima catalisa a transferência de um grupo metila da S-adenosilmetionina para o carbono da posição 5 da molécula da citosina (Figura 1). O resultado desta reação é a formação de *clusters* do dinucleotídeo CpG metilados em regiões específicas do genoma, como nos promotores e em éxons de aproximadamente 40% dos genes de mamíferos (Gardiner-Garden e Fromer, 1987). Em contraste, outras regiões do genoma de mamíferos contém poucos dinucleotídeos CpG e estes se apresentam permanentemente metilados. A diminuição da ocorrência de CpGs no genoma de forma global é melhor explicada pelo fato que citosinas metiladas são *hotspots* de mutação, levando a depleção de CpGs durante o processo evolutivo (Culondre *et al.*, 1978).

O primeiro estudo computacional em larga escala de análise de ilhas CpG foi realizado em 1987 por Gardiner-Garden e Fromer. Eles utilizaram a seqüência de genes de vertebrados depositadas no GeneBank (National Center of Biotechnology Information, NCBI) e definiram que as ilhas CpG são regiões de DNA 200 pb, ricas em GC (mais do que 50%) cuja razão entre CpGs observadas/ CpGs esperadas é maior ou igual a 0,6. Posteriormente, Larsen e cols.(1992) sugeriram que todos os genes reguladores do ciclo celular e genes com altas taxas de expressão tinham ilhas CpG na sua porção 5'. A ligação de um grupo metila no carbono 5 da citosina no dinucleotídeo CpG é a única modificação covalente observada no DNA de

vertebrados (Bird, 1986). Essa assinatura epigenética em células parentais é passada para as células-filhas com elevada fidelidade, através de um mecanismo de semi-conservação durante o processo de duplicação do material genético (Xu *et al.*, 1999).

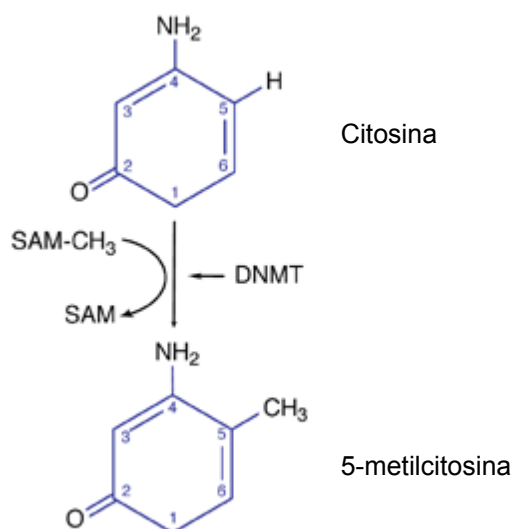


Figura 1. Mecanismo de metilação do DNA. A 5-metilcitosina é produzida pela ação de DNA metil-transferases (DNMT 1, 3a e 3b), que catalisam a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 da citosina. [Modificado de Strathdee e Brown, 2002].

A metilação do DNA está envolvida em vários processos fisiológicos, como o *imprinting* genômico e a inativação do cromossomo X. Mutações em genes que afetam o padrão global de metilação podem dar origem a várias doenças, como é o caso da síndrome do X frágil que pode ser causada pela metilação de novo da região 5' não transcrita do gene *FMR1*, o que gera, em determinadas condições, um sítio frágil no cromossomo X. Em níveis mais globais, a Síndrome ICF (Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies) é causada por mutações no gene da DNMT3b, enzima essencial no estabelecimento dos

padrões de metilação. Várias síndromes herdadas também são geradas devido à falta do “imprinting” genômico, como é o caso da síndrome de Angelman, a síndrome de Prader-Willi e a síndrome de Beckwith-Wiedemann (Egger *et al.*, 2004).

Nas células tumorais, as alterações no padrão de metilação do DNA incluem a hipometilação global do genoma (Gama-Sosa *et al.*, 1983) e a hipometilação ou hipermetilação de genes específicos, especialmente de suas regiões promotoras (Feinberg *et al.*, 2006). Tanto a hipometilação como a hipermetilação do genoma traz conseqüências epigenéticas e genéticas à célula. A Tabela 2 resume as possíveis conseqüências da alteração do estado de metilação sobre as vantagens de crescimento em células tumorais. As alterações genéticas incluem (1) mutações ponto em ilhas CpG, que podem aumentar em frequência como conseqüência da hipermetilação (Gonzalgo e Jones, 1997); (2) a instabilidade de microssatélite (MSI), associado ao silenciamento via hipermetilação do gene de reparo *MLH1* (Jones e Laird, 1999) e (3) a instabilidade genômica como conseqüência da hipometilação que aumenta a susceptibilidade à ocorrência de múltiplas mutações no genoma (Xu *et al.*, 1999). As alterações epigenéticas, por sua vez, incluem o silenciamento de genes supressores de tumor por hipermetilação, a perda do *imprinting* gênico e a ativação de oncogenes por hipometilação. Dentre estas alterações, a modificação mais importante que leva a uma vantagem de crescimento seletiva das células tumorais é o silenciamento de genes supressores de tumor mediado pela hipermetilação (Jones e Baylin, 2002).

Tabela 2

Possíveis conseqüências das modificações do perfil de metilação sobre as vantagens de crescimento seletivas que contribuem na carcinogênese.

Modificação no estado de metilação	Possíveis conseqüências	Mecanismo	Referência
Hipermetilação	A. Epigenéticas: silenciamento epigenético de genes supressores de tumor	Metilação de novo de ilhas CpG pelas DNMTs	Jones e Baylin, 2002
	B. Genéticas: aumento na freqüência de mutações de ponto	Transições C→T causadas espontaneamente ou por deaminação mediada pelas DNMTs	Gonzalzo e Jones, 1997
Hipometilação	A. Epigenéticas: proteção contra tumores intestinais	Demetilação pode causar a ativação gênica por inibição do silenciamento de genes supressores tumorais	Laird, 1995
	B. Genéticas: instabilidade genômica	Aumento da freqüência de mutações em múltiplos genes (aquisição do chamado fenótipo mutador	Chen, 1998

Adaptada de Jaenish e Bird (2003).

Atualmente, existem dois mecanismos principais pelos quais se sugere que a hipermetilação do DNA reprima a transcrição (Figura 2). O mais conhecido deles tem relação com a diminuição da afinidade de certos fatores de transcrição pelos sítios CpG quando estes estão metilados. Outro mecanismo, já bem definido, está associado à modificação na estrutura da cromatina promovida pela ligação específica de proteínas ao DNA metilado. A família de proteínas com domínio de ligação de metil-CpG, as MBPs (*methyl-CpG binding domain protein*) possuem um domínio de ligação à ilhas CpG que afetam significativamente a expressão gênica por recrutar enzimas como as histona-desacetilases (HDACs) e as histona-metiltransferases (HMTs), que promovem alterações na estrutura da cromatina, tornando-a menos acessível à maquinaria de transcrição. As HDACs promovem a desacetilação de histonas e induzem a passagem para a configuração inativa da

cromatina (desacetilada). As MBPs também recrutam as HMTs que metilam a lisina 9 das histonas H3. A histona H3 metilada então ancora a proteína HP1, que estabiliza o estado reprimido conhecido como heterocromatina e desta forma bloqueia a transcrição (Szif, 2006; Lande-Diner e Cedar, 2005).

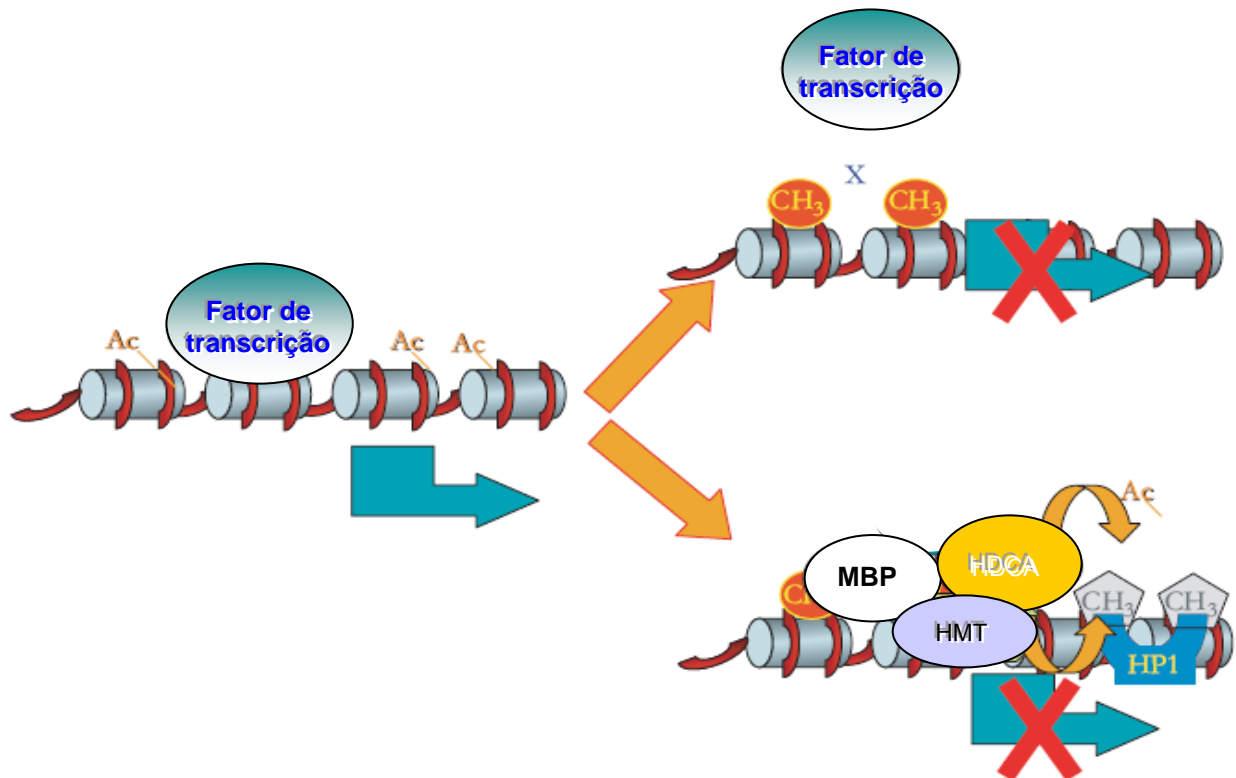


Figura 2. Silenciamento de genes através da hipermetilação. À esquerda da figura, representação de um gene ativo não-metilado e associado à histonas hiperacetiladas. A metilação de ilhas CpG dentro do sítio de reconhecimento de fatores de transcrição em regiões promotoras (parte superior direita da figura) inibem a ligação destes, resultando no bloqueio da transcrição. Através do segundo mecanismo (abaixo), ilhas CpG metiladas atraem proteínas com domínio de ligação de metil-CpG (MBPs), que por sua vez recrutam outras proteínas (HDCA, HMT e HP1) que atuam na alteração da conformação da cromatina para o seu estado inativo (heterocromatina) [Adaptado de SZYF, 2006]

A observação em diferentes estudos do efeito sinérgico das alterações genéticas e epigenéticas levaram à proposição por Feinberg e *cols.* (2006) de um modelo que atribui o desenvolvimento do câncer a três diferentes etapas: (1) inicialmente, uma alteração epigenética afetaria precursores/células tronco nos tecidos ainda normais; (2) essas subpopulações de células epigeneticamente alteradas sofreriam então mutações em genes *gatekeepers* específicos para cada tipo de tumor (classicamente considerado o primeiro estágio da evolução tumoral) e (3) estas células neoplásicas adquiririam plasticidade através da interação conjunta de reguladores genéticos e epigenéticos.

Esse modelo foi chamado de “modelo do progenitor epigenético” (Feinberg *et al.*, 2006), em contraponto ao modelo clássico de Moolgavkar & Knudson (1981) que explicava tanto a gênese como a aquisição de plasticidade pelas células neoplásicas a partir da expansão clonal de células geneticamente modificadas. Vale ressaltar, que a hipótese da alteração epigenética em precursores celulares nos tecidos como etapa inicial da carcinogênese explica uma série de estudos que têm observado hipermetilação em genes supressores de tumor em tecidos histologicamente normais (adjacentes ao tumor ou de indivíduos sem câncer) (Wettergren *et al.*, 2008, Tsou *et al.*, 2007). Da mesma forma, também embasa a observação de que, à medida que o tumor se instala, o número de diferentes genes hipermetilados aumenta significativamente. Isso pode ser comprovado na seqüência temporal de evolução do carcinoma colorretal, onde o número de genes metilados aumenta na clássica transformação da mucosa normal em adenoma e deste em carcinoma (Lee *et al.*, 2004).

2.3 A hipermetilação e o carcinoma colorretal

O carcinoma colorretal é o tipo de câncer melhor estudado atualmente em termos epigenéticos (Lee *et al.*, 2004, Frigola *et al.*, 2005, Bodmer *et al.*, 2006, Weinsenberger *et al.*, 2006). É frequentemente utilizado como modelo para estudos sobre a influência de hipermetilação de diferentes genes no desenvolvimento de tumores malignos. Isso se deve ao fato deste tumor se desenvolver em estágios bem definidos, permitindo acesso facilitado aos tecidos nos quais estas alterações podem ser identificadas e comparadas em cada estágio do desenvolvimento tumoral (Karpinski *et al.*, 2008).

Historicamente, os estudos epigenéticos em CCR foram aprofundados a partir da publicação por Toyota *e cols.* (1999) da hipótese da existência de um subgrupo de tumores colorretais que apresentava o chamado “fenótipo metilador de ilhas CpG” (CIMP+), e de outro que não o apresentava (CIMP-). A definição de CIMP+ baseou-se na hipermetilação concordante de um grupo de genes observada exclusivamente e com elevada frequência no tecido tumoral em relação aos tumores CIMP-. Estudos posteriores demonstraram que CCRs CIMP+ apresentavam uma variedade de características clínicas, histopatológicas e epidemiológicas próprias (Issa, 2004, Samowitz *et al.*, 2006), que foram posteriormente avaliadas também em outros tipos de tumor (Teodoris, 2008). A maioria dos tumores CCR CIMP+ apresentavam deficiência nos genes do sistema de reparo de *mismatch* e mutações no gene *K-RAS*. Já os CCRs CIMP- apresentavam uma maior instabilidade genética, com altas taxas de mutações em *TP53* e alterações cromossomais (por exemplo, instabilidade de microssatélites) [Teodoridis *et al.*, 2008].

Um importante estudo genômico em CCR (que utilizou a técnica quantitativa PCR/LDR Universal Array) analisou de forma comparada a metilação de 15 genes em 96 amostras de CCR e 73 mucosas macroscopicamente normais de pacientes com CCR (Chen *et al.*, 2006). Sua principal conclusão foi que a metilação é *gene-específica*, *tecido-específica* e um evento não-aleatório no câncer colorretal. Outro achado interessante deste estudo é que o perfil de metilação de um mesmo gene pode variar quando analisado diretamente em amostras clínicas ou em diferentes linhagens celulares de um mesmo tipo de tumor crescidas em cultura. Por isso, dados gerados por estudos de metilação nestes dois tipos de material devem ser analisados com critérios distintos.

Somado a estas questões, muitos trabalhos também têm investigado a influência de fatores ambientais sobre a hipermetilação de DNA em CCR, como a dieta (Nystrom e Mutanen, 2009), o tabaco (Samovitz *et al.*, 2006) e a infecção por vírus oncogênicos como o JC vírus (Goel *et al.*, 2006) e o Epstein Baar (Etoh *et al.*, 2004). A dieta é o componente ambiental mais importante no desenvolvimento do CCR (Karpinski, 2008). O folato, na forma de metil-tetraidrofolato (metil-THF) está envolvido na remetilação da homocisteína à metionina, que é um precursor direto da S-adenosilmetionina, o doador de grupos metila na maioria das reações de metilação. Por isso, sugere-se que a deficiência de folato na dieta poderia aumentar o risco do desenvolvimento de CCR pela indução de hipometilação do genoma (Lee e Zhu, 2006).

2.3.1 Implicações da hipermetilação do DNA no diagnóstico, prognóstico e tratamento

A metilação anormal pode ser útil na prática clínica de três maneiras. Em primeiro lugar, se a hipermetilação de determinado gene ocorre especificamente em células neoplásicas, esta informação pode ser empregada no diagnóstico de diferentes tumores à partir de biópsias ou em células livres no plasma. Segundo, se a hipermetilação de determinado locus estiver associada ao fenótipo da doença, como a agressividade tumoral, resposta à quimioterapia ou ocorrência de efeitos adversos, poderia ser útil na previsão do prognóstico da doença. E por último, se a hipermetilação de certas ilhas CpG em tecidos não-tumorais estiver associada ao risco para o desenvolvimento tumoral, esta poderia ser utilizada como um biomarcador precoce na avaliação do risco de se desenvolver certo tipo de câncer (Myamoto e Ushijima, 2005).

A hipermetilação parece desempenhar dois papéis distintos no desenvolvimento do CCR. A hipermetilação progressiva associada à idade leva ao silenciamento de um grupo de genes denominados “Tipo A” (do inglês *aging*) que estão frequentemente hipermetilados no cólon normal, mesmo antes que o CCR surja (Issa *et al.*, 1994), e por isso podem servir como biomarcadores de detecção ou diagnóstico precoce do CCR (Toyota *et al.*, 1999; Issa, 2000). Outro grupo de genes apresenta-se hipermetilado exclusivamente em lesões pré-invasivas e/ ou cânceres, e são chamados de genes “Tipo C” (de *cancer*) e a sua detecção seria útil no diagnóstico de CCR já desenvolvido (Toyota *et al.*, 1999; Toyota *et al.* 2000; Rashid *et al.*, 2001).

Grandes esforços estão sendo empregados da definição de um painel único de genes “Tipo C” com validade diagnóstica no CCR (Xu *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Frigola *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005a). A definição original de CIMP incluiu os seguintes genes “Tipo C”: *MINT27*, *MINT2*, *MINT1*, *MINT12*, *MINT17*, *MINT31*, *MINT25*, *CDKN2A*, *THBS1* e *MLH1* [Toyota *et al.*, 1999], porém não se mostrou uma classificação adequada. Mais recentemente, um robusto estudo genômico independente avaliou um grande número de genes candidatos e selecionou cinco novos marcadores (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* e *SOCS1*) [Weisenberger *et al.*, 2006]. Este painel determinou de forma mais precisa a classificação dos CCR como CIMP+ e CIMP-, pois foi validado quantitativamente e confirmado posteriormente por outros autores (Ogino, 2007a, Ogino, 2007b), aproximando a possibilidade de utilização destes marcadores epigenéticos da prática clínica.

A hipermetilação de genes “Tipo A” pode ser usada como um marcador em potencial do risco de desenvolvimento de neoplasias de forma precoce. De fato, a hipermetilação de três diferentes *loci* distintos do cromossomo 16 (D16S32, TAT E D16S7), que em células de fígado normal se apresentam não-hipermetiladas, está significativamente aumentada na mucosa aparentemente normal de pacientes submetidos a condições sabidamente pré-cancerosas, como hepatite crônica e cirrose (Kanai e Hirohashi, 2007). Adicionalmente, a hipermetilação anormal do gene *p16* parece ser um evento precoce no desenvolvimento do câncer de pulmão, pois foi detectada tanto em pacientes com câncer de pulmão já desenvolvido como em pacientes sem tumor porém fumantes, fator de risco crucial no desenvolvimento deste tipo de câncer (Belinski *et al.*, 1998).

Alguns estudos demonstraram que a hipermetilação também pode influenciar no prognóstico da doença. No CCR, a hipermetilação do *CDKN2A* (*p16*) na mucosa

aparentemente normal adjacente ao tumor é um fator prognóstico independente associado à menor sobrevida de pacientes com CCR em estágios A a C (classificação de Dukes) [Wettergren *et al.*, 2008]. Amara e cols. (2008) demonstraram que em linfomas a hipermetilação em diferentes genes está relacionada a um pior prognóstico da doença, como detecção em estágios avançados (*CDKN2A*), resistência ao tratamento (*DAPK*), menor sobrevida global (*DAPK*, *CDKN2A* e *VHL*) e livre de doença (*VHL*).

Diferente das mutações de ponto e cromossômicas, as alterações epigenéticas são farmacologicamente reversíveis (Kopelovich *et al.*, 2003). A reativação transcricional não-específica do genoma tem sido restabelecida pela utilização de inibidores de metilação e inibidores da desacetilação de histonas (ácido suberoilânilida hidroxâmico – SAHA, tricostatina A e ácido valpróico) associados a agentes antineoplásicos (Lande-Diner e Cedar, 2005). Os agentes desmetilantes 5-azacitidina e o seu derivado 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-dC) são inibidores potentes da metilação do DNA, pois incorporam-se na fita de DNA de células em divisão, formando um complexo com as DNMTs e as inativam (Jones e Taylor, 1980). Clinicamente, desde os anos 90, o 5-aza-dC era usado em altas dosagens (75-100 mg/m²/dia) como droga citotóxica. Por volta do ano 2000, este mesmo agente mostrou efetivo em baixas dosagens (45-50mg/m²/dia), na terapia de tumores hematológicos (Kantarjian *et al.*, 2003). A mielossupressão se mostrou o seu pior efeito adverso, além da baixa estabilidade em solução aquosa. A zebularina apresenta vantagens em relação a 5-aza-dC (Cheng *et al.*, 2004). Outra droga inibidora da metilação é a procainamida, usada no tratamento de arritmias cardíacas. É um inibidor não-competitivo das DNMTs, e se mostrou efetiva na

reativação da *GSTP1* silenciada via metilação em tumores de próstata em roedores (Lin *et al.*, 2001).

Considerando o fato de a hipermetilação ser um evento precoce na carcinogênese, tem-se testado a ação de diferentes agentes incorporados à dieta que possam ser usadas na prevenção do CCR devido à sua ação desmetilante. A epigallocatequina-3-galato (Fang *et al.*, 2003), princípio ativo encontrado no chá-verde, e o selênio (Xiang *et al.*, 2008) podem servir como importantes agentes quimiopreventivos do câncer. Xiang e cols. (2008) demonstraram que o tratamento com selênio diminui a metilação de forma global e provoca desmetilação parcial e reativação da expressão do gene supressor tumoral *APC*, envolvido no crescimento tumoral e metastização. A expressão de muitas enzimas envolvidas no metabolismo de grupos metila pode ser regulada pela dieta, como a disponibilidade de nutrientes incluindo aminoácidos essenciais, vitamina B2, B6, B12 e o zinco (Lee e Zhu, 2006).

Apesar do potencial terapêutico destes agentes, é preciso ter muita cautela na sua aplicação clínica. Tendo em vista a ação não-específica destes agentes, os mesmos podem levar à ativação de oncogenes por hipometilação, sendo impossível prever seu efeito final no desenvolvimento de tumores (Lande-Diner e Cedar, 2005). Outra desvantagem é o fato de que a metilação de determinado alvo gênico é restabelecida logo que o efeito do medicamento cessa, e por isso existe a necessidade de terapias continuadas (Jones e Baylin, 2002). Enfim, o desenvolvimento de terapia epigenética ideal deveria ser gene-específica, usando, por exemplo, fatores de transcrição projetados para um alvo específico ou através do emprego de microRNA (Feinberg *et al.*, 2006).

2.4 Alterações no padrão de metilação dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1*

Estudos apontam uma ampla variação na frequência de hipermetilação dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* em diferentes tumores primários. A Tabela 3 apresenta as frequências de hipermetilação destes genes observadas em diferentes neoplasias malignas, entre elas, o CCR.

2.4.1 Gene *CDX1*

O gene *Caudal-type homeobox 1 (CDX1)* codifica um fator de transcrição requerido para a expressão específica de um número significativo de genes em enterócitos, que regulam a proliferação e a diferenciação do epitélio intestinal (Freund *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2004^a). Os homólogos CDX' (*CDX1* e *CDX2*) modulam diversos processos, incluindo apoptose, adesão celular e aquisição de morfologia colunar pelos enterócitos (Crissey *et al.*, 2008). De fato, um estudo demonstrou recentemente que *CDX1* aumenta a expressão de PPAR-gamma, o principal regulador transcricional da diferenciação intestinal, pela interação funcional com a proteína C/EBP alpha (CCAAT/enhancer-binding alpha) (Park *et al.*, 2009).

No entanto, o envolvimento do gene *CDX1* no desenvolvimento do CCR é controverso. Historicamente, o gene *CDX1* foi descrito como um oncogene devido ao achado de que este promoveria proliferação de duas linhagens de células de tumor colorretal em cultura (IEC6 e Caco-2) (Lorentz *et al.*, 1997, Soubeyran *et al.*, 2001).

Tabela 3

Freqüência de hipermetilação dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* em diferentes neoplasias.

Gene	Varição da frequência de hipermetilação	Neoplasia	Referências
CDX1			
	100%	Carcinoma colorretal	Xu <i>et al.</i> , 2004, Pillozzi <i>et al.</i> , 2004
GSTP1			
	0-16%	Carcinoma colorretal	Esteller <i>et al.</i> , 1998, Bai <i>et al.</i> , 2004, Lee <i>et al.</i> , 2004, Kim <i>et al.</i> , 2005a
	23 - 59%	Linfoma de grandes células-B	Nakamichi <i>et al.</i> , 2007, Amara <i>et al.</i> , 2008
	14 - 38,9%	Adenocarcinoma de mama	Shinozaki <i>et al.</i> , 2005; Arai <i>et al.</i> , 2006; Lee <i>et al.</i> , 2007; Sunami <i>et al.</i> , 2008
	46%	Adenocarcinoma de pulmão	Kim <i>et al.</i> , 2005b
	6 - 29%	Carcinoma de pulmão de não-pequenas células	Zöchbauer-Müller <i>et al.</i> , 2001; Vallböhmer <i>et al.</i> , 2006,
	0 - 40%	Carcinoma gástrico	Esteller <i>et al.</i> , 2001; Kang <i>et al.</i> , 2003; Hong <i>et al.</i> , 2005; Chang <i>et al.</i> , 2006; Tamura, 2006; Kwabi-Addo <i>et al.</i> , 2007; Poplawski <i>et al.</i> , 2008
	24 - 88%	Carcinoma hepatocelular	Wang <i>et al.</i> , 2006; Nomoto <i>et al.</i> , 2007; Su <i>et al.</i> , 2007; Ko <i>et al.</i> , 2008
	93	Carcinoma de próstata	Ellinger <i>et al.</i> , 2008a
	22 - 24%	Carcinoma de ovário	[células da granulosa, Dhillon <i>et al.</i> , 2004], [tipo seroso, Makarla <i>et al.</i> , 2005]
		Carcinoma de células escamosas da vulva	Stephen <i>et al.</i> , 2009
	72%	Tumores da pituitária	Yuan <i>et al.</i> , 2008
TWIST1*			
	23 - 59%	Adenocarcinoma de mama	Fackler <i>et al.</i> , 2003; Mehrotra <i>et al.</i> , 2004; Martin <i>et al.</i> , 2005; Shinozaki <i>et al.</i> , 2005; Li <i>et al.</i> , 2006; Locke <i>et al.</i> , 2007; Sunami <i>et al.</i> , 2008
	24%	Tumor de células da granulosa do ovário	Dhillon <i>et al.</i> , 2004
	82%	Adenocarcinoma de pulmão	Tsou <i>et al.</i> , 2007

* A freqüência de metilação de *TWIST1* ainda não foi descrita para o CCR.

Entretanto, achados posteriores demonstraram que a expressão ectópica de *CDX1* em células de CCR inibe a proliferação pelo bloqueio da atividade transcricional via β -catenina/fator de células T (Guo *et al.*, 2004b), e que sua expressão também não promove alterações na proliferação ou diferenciação do epitélio normal e não aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores (Crissey *et al.*, 2008, Bohhomme *et al.*, 2008).

A despeito desta discussão, a análise da expressão de *CDX1* em amostras de tumores humanos revelou diminuição nos níveis de *CDX1* através do silenciamento associado à hipermetilação (Suh *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 2004, Pillozzi *et al.*, 2004), o que pode sugerir que este gene seja potencialmente um supressor tumoral. Wong e cols. (2004) descreveram, pela primeira vez, a relação entre a perda da expressão de *CDX1* em CCR com a hipermetilação do promotor deste gene em linhagens de células tumorais cultivadas *in vitro*. Xu e cols. (2003) observaram que *CDX1* apresenta-se metilado em 100% (65/65) dos casos numa amostra que incluía tecidos provindos de pacientes com CCR esporádico, HNPCC, de adenomas colorretais e da mucosa adjacente normal. Um estudo interessante de Lu e cols. (2008) demonstrou que, apesar de ambas as linhagens de células de CCR em cultura (HT29 e Caco2) não expressarem *CDX1*, somente na linhagem Caco2 essa inativação é devido à metilação. Esse achado prova a heterogeneidade e a individualidade característica dos tumores já bem descrita, e expande a atenção para outros mecanismos de controle transcricional, que podem sobrepor-se à metilação ou controlar de forma ativa a sua expressão.

Até o momento, a avaliação da hipermetilação de *CDX1* em CCR falha pela ausência de informações sobre o perfil de metilação no cólon normal, assim como sua correlação com as características clinicopatológicas do paciente com CCR. A

metilação do gene *CDX1* não foi até o momento estudado em nenhuma outra neoplasia (Tabela 5), provavelmente devido à sua expressão intestino-específica. No entanto, sua avaliação em outros tumores do trato gastrointestinal se mostra válida, devido a metilação aumentada de *CDX1* ter sido observada na metaplasia de Barrett (Wong *et al.*, 2005), lesão precursora de tumores esofagianos onde ocorre “intestinalização” do epitélio escamoso. Adicionalmente, um trabalho *in vivo* demonstrou que uma dieta pobre em doadores de grupo metila (folato) leva à alteração na expressão do *CDX1* e do *CDX2* e, portanto, essa alteração poderia ser responsável pelo efeito protetor atribuído ao folato da dieta (Lu *et al.*, 2008). Tendo em vista a necessidade de estudos complementares devido a importância do gene *CDX1* no entendimento completo da carcinogênese colorretal, o gene *CDX1* foi incluído no grupo de genes a serem avaliados neste trabalho.

2.4.2 Gene *GSTP1*

O gene *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1), localizado no cromossomo 11, codifica a isoenzima detoxificadora denominada GST π (GST pi), que pertence à família de enzimas glutathione-S-transferases (GST) [Mannervik e Danielson, 1988]. Estas são capazes de metabolizar uma variada gama de agentes químicos, pois catalisam a conjugação da glutathione com compostos eletrofílicos potencialmente reativos e citotóxicos ao DNA. Por esta razão, protegem o DNA e outras importantes biomoléculas do dano causado por agentes quimioterápicos, carcinógenos e poluentes ambientais (Esteller *et al.*, 1998). Ratos *knockout* para o gene *GSTP1* apresentaram risco aumentado de desenvolver tumores de pele induzidos por carcinógenos (Herderson *et al.*, 1998). Ates e cols. (2005) demonstraram que o

polimorfismo de GSTs tem forte associação com o risco aumentado de desenvolvimento de carcinoma colorretal e que, desta forma, variações no genótipo dos pacientes poderiam ser indicativos de elevada predisposição ao CCR. Outro mecanismo pelo qual o gene *GSTP1* poderia contribuir para a carcinogênese do CCR é através do mecanismo de silenciamento gênico e conseqüentemente perda da expressão de *GSTP1* por hipermetilação (Esteller *et al.*, 1998, Bai *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005a).

A freqüência de hipermetilação de *GSTP1* no CCR variou em diferentes estudos (Tabela 4). A maioria deles analisa a hipermetilação do tecido tumoral comparada com adenomas, porém nenhum deles utiliza a mucosa macroscopicamente normal de pacientes com CCR, e somente dois estudos analisam mucosa colônica normal em pacientes sem CCR. Os achados em tecido normal, no entanto, são a condição que validam a hipermetilação como biomarcador útil na detecção e diagnóstico precoce. O uso em potencial da hipermetilação de *GSTP1* como ferramenta de screening do CCR foi sugerida pela sua identificação diretamente das fezes de pacientes com CCR, com sensibilidade e especificidade de 75 e 68%, respectivamente (Leung *et al.*, 2007).

Tabela 4

Avaliação da freqüência de metilação de *GSTP1* em diferentes estudos envolvendo pacientes com e sem CCR.

Referência	Freqüência de hipermetilação			
	CCR	Adenomas	Mucosa macroscopicamente normal de pacientes com CCR	Mucosa normal de pacientes sem CCR
Kim <i>et al.</i> , 2005	16%	10%	NA	NA
Lee <i>et al.</i> , 2004	10%	0%	NA	0%
Esteller <i>et al.</i> , 1998	4%	NA	NA	NA
Bai <i>et al.</i> , 2004	0%	0%	NA	0%

NA= não analisada.

Estudos têm investigado a frequência de hipermetilação do gene *GSTP1* em outros tipos de neoplasias primárias (Tabela 3), nos quais nota-se uma ampla variação. De forma complementar, vários estudos demonstraram que a hipermetilação de *GSTP1* é um evento precoce. Como exemplo, no adenocarcinoma de mama, a frequência de hipermetilação de *GSTP1* vai aumentando à medida que o tumor se instala, sendo de 16% na hiperplasia ductal, 37% no carcinoma ductal *in situ* e de 38% no carcinoma ductal invasor (Lee *et al.*, 2007). No carcinoma hepatocelular, já é possível detectar hipermetilação aberrante de *GSTP1* em 69% das amostras de mucosa normal adjacente ao tumor (e em 88% dos carcinomas hepatocelulares), o que sugere que a hipermetilação de *GSTP1* pode ser um biomarcador na prevenção de tumores pelo seu uso no diagnóstico precoce (Wang *et al.*, 2006).

Devido a esta sua característica, muitos trabalhos têm investigado a possibilidade de detecção da hipermetilação precoce de *GSTP1* em DNA livre (normalmente originado de células tumorais necrosadas) presente em diferentes fluidos corporais, dispensando assim a necessidade de cirurgias invasivas para obtenção de DNA para análise. A detecção de hipermetilação de *GSTP1* já se mostrou possível, apesar de menos sensível, em amostras de sangue de pacientes com carcinoma de próstata (Chuang *et al.*, 2007; Rouprêt *et al.*, 2008; Ellinger *et al.*, 2008b; Bastian *et al.*, 2008) e de urina para carcinoma de próstata (Rouprêt *et al.*, 2007; Woodson *et al.*, 2008,) e de bexiga (Hoque *et al.*, 2006).

A hipermetilação mantida de *GSTP1* mostrou estar relacionada ao prognóstico em diferentes estudos. Em tumores de mama, a hipermetilação de *GSTP1* foi mais frequente em pacientes com metástase em linfonodos em relação aos que não as apresentavam (Arai *et al.*, 2006; Sunami *et al.*, 2008). Neste trabalho

de Arai e cols. (2006), a hipermetilação de *GSTP1* foi relacionada a tumores de maior tamanho e à menor sobrevida livre de doença. Da mesma forma, a hipermetilação de *GSTP1* é mais freqüente em tumores invasivos da pituitária (85%) do que em adenomas (59%) e em graus II, III e IV (Yuan *et al.*, 2008). No carcinoma da próstata, a hipermetilação de *GSTP1* (conjuntamente com a de APC e PTGS2) tem relação com escores de Gleason mais elevados (Ellinger *et al.*, 2008a). No entanto, diferente do que ocorre nos tumores sólidos, em tumores hematológicos a metilação de *GSTP1* está relacionada à uma maior sobrevida em 5 anos comparada ao grupo de pacientes que não apresentaram metilação deste gene (Nakamichi *et al.*, 2007).

Portanto, apesar da hipermetilação de *GSTP1* já ter sido avaliada em CCR assim como em outras neoplasias, e considerando o seu potencial como biomarcador precoce do câncer, visamos avaliar neste estudo a freqüência comparada da metilação de *GSTP1* no tumor e na mucosa normal, no intuito de que possa ser utilizado futuramente como ferramenta na prevenção e/ou prognóstico no CCR.

2.4.3 Gene TWIST1

O gene *TWIST1*, também conhecido como *TWIST*, codifica um fator de transcrição hélice-volta-hélice (bHLH) que foi inicialmente identificado em *Drosophila* como um importante regulador da morfogênese embriológica. Em mamíferos, está envolvido na diferenciação de diversas linhagens celulares mesodérmicas, incluindo a derme, os ossos, cartilagens e músculo (Füchtbauer, 1995). O gene *TWIST1* humano está localizado no cromossomo 7p21.2 (Song *et al.*, 2006).

Vários achados sugerem o envolvimento de *TWIST1* no desenvolvimento do câncer (Maestro *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2006; Vesuna, 2008). Maestro e cols. (1999) demonstraram que *TWIST1* é um oncogene que inibe a via da apoptose p53-dependente e que sua expressão está aumentada em rabdmiossarcomas. De fato, a hiperexpressão de *TWIST1* foi observada em diferentes tumores, como de mama (Yang *et al.*, 2004), da próstata (Kwok *et al.*, 2005), endometriais (Kyo *et al.*, 2006), gástricos (Rozivatz *et al.*, 2002) e em gliomas (Elias *et al.*, 2005). A expressão ectópica de *TWIST1* resulta na perda da adesão célula-célula mediada pela E-caderina e no conseqüente ganho de motilidade celular (Yang *et al.*, 2004). Posteriormente, expressão de *TWIST1* foi relacionada ao processo metastático por conduzir a transição de células tumorais epiteliais à um fenótipo mesenquimal invasor (fenômeno denominado transição epitélio-mesenquimal, EMT) (Yang *et al.*, 2006) e à aquisição de resistência à drogas (Wang *et al.*, 2004).

Sendo *TWIST1* um oncogene, esperaria-se que seu promotor estivesse hipometilado em células tumorais, fato que poderia explicar, pelo menos parcialmente, a hiperexpressão observada em diferentes tipos de tumor. No entanto, ao contrário, a hipermetilação do gene *TWIST1* tem sido extensivamente descrita em diferentes estudos em câncer de mama (Fackler *et al.*; 2003, Mehrotra *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Shinozaki *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Locke *et al.*, 2007; Sunami, 2008) e em outros tipos de neoplasias como o adenocarcinoma de pulmão (com freqüência elevada de 82% no tumor) [Tsou *et al.*, 2007] e o tumor de células da granulosa do ovário (Dhilon *et al.*, 2004). Esta relação controversa entre a hipermetilação do gene e a hiperexpressão tecidual de *TWIST1* ainda precisa ser avaliada em CCR.

Foram descritos até o momento mecanismos complementares de controle de expressão *in vivo* de *TWIST1*. Yang e cols. (2008) descreveram pela primeira vez que *TWIST1* é alvo direto de ligação de HIF-1 α (hypoxia induced factor-1 alpha), proteína que se acumula em condições de hipóxia, frequentemente associada ao microambiente no interior dos tumores, e que esta ligação levaria ao acúmulo de *TWIST1* observado nos tumores e ao processo de metástase. Outra hipótese levantada baseia-se no achado de que *TWIST1* é substrato de clivagem por caspases e degradação mediada por proteossomos, o que demonstra que sua concentração nas células é possivelmente regulada em etapas pós-transcricionais (Demontis, 2006). Juntos, estes achados indicam inicialmente que, devido ao papel central de *TWIST1* na invasividade tumoral, sua expressão provavelmente está sob o comando orquestrado de uma série de reguladores, poucos deles já esclarecidos até o momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Laatiri A, Hachana M, Korbi S. Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*. 2008 Oct;19(10):1774-86.
2. Ateş NA, Tamer L, Ateş C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, Camdeviren H. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet*. 2005 Apr;43(3-4):149-63.
3. Bai AH, Tong JH, To KF, Chan MW, Man EP, Lo KW, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer*. 2004 Dec;112(5):846-53.
4. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Rogers CG, Lin X, Mangold LA, et al. CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer. *J Urol*. 2008 Feb;179(2):529-34; discussion 534-5.
5. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006 Feb;6(2):107-16.
6. Belinsky SA, Nikula KJ, Palmisano WA, Michels R, Saccomanno G, Gabrielson E, et al. Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep;95(20):11891-6.

7. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986 May;321(6067):209-13.
8. Bock C, Lengauer T. Computational epigenetics. *Bioinformatics*. 2008 Jan;24(1):1-10.
9. Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet*. 2006;51(5):391-6.
10. Bonhomme C, Calon A, Martin E, Robine S, Neuville A, Keding M, et al. CDX1, a dispensable homeobox gene for gut development with limited effect in intestinal cancer. *Oncogene*. 2008 Jul 24;27(32):4497-502.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
12. Brena RM, Costello JF. Genome-epigenome interactions in cancer. *Hum Mol Genet*. 2007 Apr;16 Spec No 1:R96-105.
13. Chang MS, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Sakuma K, Ishikawa S, et al. CpG island methylation status in gastric carcinoma with and without infection of Epstein-Barr virus. *Clin Cancer Res*. 2006 May;12(10):2995-3002.
14. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998 Sep 3;395(6697):89-93.
15. Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, et al. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*. 2004 Aug;6(2):151-8.
16. Cheng YW, Shawber C, Notterman D, Paty P, Barany F. Multiplexed profiling of candidate genes for CpG island methylation status using a flexible PCR/LDR/Universal Array assay. *Genome Res*. 2006 Feb;16(2):282-9.
17. Chuang CK, Chu DC, Tzou RD, Liou SI, Chia JH, Sun CF. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma. *Cancer Detect Prev*. 2007;31(1):59-63.
18. Cordeiro F, Yamaguchi NH, Habr-Gama A, Cutait R, Reinan RJ, Abramoff R, Perdicaris M, Moraes A. Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal. In: Associação Médica Brasileira. Conselho Federal de Medicina. Projeto Diretrizes Volume I. São Paulo: AMB/CFR; 2001. p.1-12.
19. Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W. Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature*. 1978 Aug 24;274(5673):775-80.
20. Crissey MA, Guo RJ, Fogt F, Li H, Katz JP, Silberg DG, et al. The homeodomain transcription factor CDX1 does not behave as an oncogene in normal mouse intestine. *Neoplasia*. 2008 Jan;10(1):8-19.
21. DATASUS [base de dados na Internet]. Brasília (BR): Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. [acesso em 2009 Jan 23]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2007/c10.def>.
22. Demontis S, Rigo C, Piccinin S, Mizzau M, Sonogo M, Fabris M, Brancolini C, Maestro R. TWIST is substrate for caspase cleavage and proteasome-mediated degradation. *Cell Death Differ*. 2006 Feb;13(2):335-45.
23. Dhillon VS, Aslam M, Husain SA. The contribution of genetic and epigenetic changes in granulosa cell tumors of ovarian origin. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug;10(16):5537-45.

24. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004 May;429(6990):457-63.
25. Elias MC, Tozer KR, Silber JR, Mikheeva S, Deng M, Morrison RS, et al. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia*. 2005 Sep;7(9):824-37.
26. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate*. 2008 Jan;68(1):42-9.
27. Ellinger J, Bastian PJ, Jurgan T, Biermann K, Kahl P, Heukamp LC, et al. CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urology*. 2008 Jan;71(1):161-7.
28. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*. 2002 Jan;196(1):1-7.
29. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*. 1998 Oct;58(20):4515-8.
30. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr;61(8):3225-9.
31. Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, et al. Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol*. 2004 Feb;164(2):689-99.
32. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, Garrett E, Mehrotra J, Polyak K, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and TWIST in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer*. 2003 Dec 20;107(6):970-5.
33. Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*. 2003 Nov;63(22):7563-70.
34. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun;61(5):759-67.
35. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006 Jan;7(1):21-33.
36. Freund JN, Domon-Dell C, Kedingler M, Duluc I. The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol*. 1998;76(6):957-69.
37. Frigola J, Solé X, Paz MF, Moreno V, Esteller M, Capellà G, Peinado MA. Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2005 Jan;14(2):319-26.
38. Füchtbauer EM. Expression of M-TWIST during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn*. 1995 Nov;204(3):316-22.
39. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*. 1983 Oct;11(19):6883-94.
40. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987 Jul;196(2):261-82.
41. Goel A, Li MS, Nagasaka T, Shin SK, Fuerst F, Ricciardiello L, Wasserman L, Boland CR. Association of JC virus T-antigen expression with the methylator phenotype in sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology*. 2006 Jun;130(7):1950-61.

42. Gonzalzo ML, Jones PA. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res.* 1997 Apr;386(2):107-18.
43. Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004 Jul;3(7):593-601.
44. Guo RJ, Huang E, Ezaki T, Patel N, Sinclair K, Wu J, et al. CDX1 inhibits human colon cancer cell proliferation by reducing beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36865-75.
45. Habr-Gama A. Câncer colorretal - a importância de sua prevenção. *Arq Gastroenterol.* 2005 Jan-Mar; 42(1):2-3.
46. Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr;95(9):5275-80.
47. Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, Kwon JG, Sohn YK, Kwak EK, Kim JW. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *J Korean Med Sci.* 2005 Apr;20(2):236-41.
48. Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, et al. Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jul;98(14):996-1004.
49. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin SB. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet.* 1994 Aug;7(4):536-40.
50. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Dec;4(12):988-93.
51. Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;910:140-53.
52. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:245-54.
53. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology.* 2002 Sep;123(3):862-76.
54. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980 May;20(1):85-93.
55. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002 Jun;3(6):415-28.
56. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999 Feb;21(2):163-7.
57. Kanai Y, Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis* 2007 Dec;28(12):2434-42.
58. Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest.* 2003 May;83(5):635-41.
59. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderl S, Issa JP, et al. Results of decitabine (5-aza-2'deoxyctidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer.* 2003 Aug 1;98(3):522-8.
60. Karpiński P, Sasiadek MM, Blin N. Aberrant epigenetic patterns in the etiology of gastrointestinal cancers. *J Appl Genet.* 2008;49(1):1-10.
61. Kim HC, Roh SA, Ga IH, Kim JS, Yu CS, Kim JC. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005 Dec;20(12):1920-6.

62. Kim YT, Park SJ, Lee SH, Kang HJ, Hahn S, Kang CH, et al. Prognostic implication of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in adenocarcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Nov;130(5):1378.
63. Ko E, Kim Y, Kim SJ, Joh JW, Song S, Park CK, Park J, Kim DH. Promoter hypermethylation of the p16 gene is associated with poor prognosis in recurrent early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Sep;17(9):2260-7.
64. Kopelovich L, Crowell JA, Fay JR. The epigenome as a target for cancer chemoprevention. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Dec;95(23):1747-57.
65. Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, Ittmann M, Wheeler T, Jelinek J, et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul;13(13):3796-802.
66. Kwok WK, Ling MT, Lee TW, Lau TC, Zhou C, Zhang X, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res.* 2005 Jun;65(12):5153-62.
67. Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, Mizumoto Y, Maida Y, Hashimoto M, et al. High TWIST expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol.* 2006 Apr;37(4):431-8.
68. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell.* 1995 Apr;81(2):197-205.
69. Lande-Diner L, Cedar H. Silence of the genes-mechanisms of long-term repression. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):648-54.
70. Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics.* 1992 Aug;13(4):1095-107.
71. Lee JS. GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Arch.* 2007 Jun;450(6):637-42.
72. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest.* 2004 Jul;84(7):884-93.
73. Lee WJ, Zhu BT. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis.* 2006 Feb;27(2):269-77.
74. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg.* 2002 Jul;89(7):845-60.
75. Leung WK, To KF, Man EP, Chan MW, Hui AJ, Ng SS, et al. Detection of hypermethylated DNA or cyclooxygenase-2 messenger RNA in fecal samples of patients with colorectal cancer or polyps. *Am J Gastroenterol.* 2007 May;102(5):1070-6.
76. Li S, Rong M, Iacopetta B. DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett.* 2006 Jun;237(2):272-80.
77. Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, et al. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Res.* 2001 Dec ;61(24):8611-6.
78. Lind GE, Thorstensen L, Løvig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, et al. CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer.* 2004 Oct;3:28.
79. Locke I, Kote-Jarai Z, Fackler MJ, Bancroft E, Osin P, Nerurkar A, et al. Gene promoter hypermethylation in ductal lavage fluid from healthy BRCA gene

- mutation carriers and mutation-negative controls. *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R20.
80. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol.* 1997 Dec;139(6):1553-65.
 81. Lu X, Freund JN, Muller M, Ravey J, Nicolas JP, Gueant JL, et al. Differential regulation of CDX1 and CDX2 gene expression by deficiency in methyl group donors. *Biochimie.* 2008 May;90(5):697-704.
 82. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, et al. TWIST is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev.* 1999 Sep;13(17):2207-17.
 83. Makarla PB, Saboorian MH, Ashfaq R, Toyooka KO, Toyooka S, Minna JD, et al. Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 1;11(15):5365-9.
 84. Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988;23(3):283-337.
 85. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and TWIST and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2005 Jun;12(6):488-96.
 86. Mehrotra J, Vali M, McVeigh M, Kominsky SL, Fackler MJ, Lahti-Domenici J, et al.. Very high frequency of hypermethylated genes in breast cancer metastasis to the bone, brain, and lung. *Clin Cancer Res.* 2004 May;10(9):3104-9.
 87. Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol.* 2005 Jun;35(6):293-301.
 88. Moolgavkar SH, Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1981 Jun;66(6):1037-52.
 89. Nomoto S, Kinoshita T, Kato K, Otani S, Kasuya H, Takeda S, et al. Hypermethylation of multiple genes as clonal markers in multicentric hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2007 Nov;97(9):1260-5.
 90. Nystrom M, Mutanen M. Diet and epigenetics in colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2009 Jan;15(3):257-63.
 91. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn.* 2007 Jul;9(3):281-3.
 92. 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 May;450(5):529-37.
 93. Park MJ, Kim HY, Kim K, Cheong J. Homeodomain transcription factor CDX1 is required for the transcriptional induction of PPARgamma in intestinal cell differentiation. *FEBS Lett.* 2009 Jan 5;583(1):29-35.
 94. Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):735-40.
 95. Pillozzi E, Onelli MR, Ziparo V, Mercantini P, Ruco L. CDX1 expression is reduced in colorectal carcinoma and is associated with promoter hypermethylation. *J Pathol.* 2004 Nov;204(3):289-95.
 96. Poplawski T, Tomaszewska K, Galicki M, Morawiec Z, Blasiak J. Promoter methylation of cancer-related genes in gastric carcinoma. *Exp Oncol.* 2008 Jun;30(2):112-6.

97. Rashid A, Shen L, Morris JS, Issa JP, Hamilton SR. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):1129-35.
98. Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubert B, Busch R, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and TWIST in gastric cancer. *Am J Pathol.* 2002 Nov;161(5):1881-91.
99. Rouprêt M, Hupertan V, Catto JW, Yates DR, Rehman I, Proctor LM, et al. Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *Int J Cancer.* 2008 Feb;122(4):952-6.
100. Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, Catto JW, Rehman I, Meuth M, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar;13(6):1720-5.
101. Samowitz WS, Ogino S. DNA methylation in breast and colorectal cancers. *Mod Pathol.* 2008 Aug;21(8):1054.
102. Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec;98(23):1731-8.
103. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar;11(6):2156-62.
104. Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, et al. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar;11(6):2156-62.
105. Simmang CL, Senatore P, Lowry A, Hicks T, Burnstein M, Dentsman F, et al. Practice parameters for detection of colorectal neoplasms. The Standards Committee, The American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum.* 1999 Sep;42(9):1123-9.
106. Song LB, Liao WT, Mai HQ, Zhang HZ, Zhang L, Li MZ, et al. The clinical significance of TWIST expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2006 Oct;242(2):258-65.
107. Soubeyran P, Haglund K, Garcia S, Barth BU, Iovanna J, Dikic I. Homeobox gene CDX1 regulates Ras, Rho and PI3 kinase pathways leading to transformation and tumorigenesis of intestinal epithelial cells. *Oncogene.* 2001 Jul;20(31):4180-7.
108. Stephen JK, Chen KM, Raitanen M, Grénman S, Worsham MJ. DNA hypermethylation profiles in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Pathol.* 2009 Jan;28(1):63-75.
109. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med.* 2002 Mar;4(4):1-17.
110. Suh ER, Ha CS, Rankin EB, Toyota M, Traber PG. DNA methylation down-regulates CDX1 gene expression in colorectal cancer cell lines. *J Biol Chem.* 2002 Sep;277(39):35795-800.
111. Sunami E, Shinozaki M, Sim MS, Nguyen SL, Vu AT, Giuliano AE, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R46.
112. Szyf M. Targeting DNA methylation in cancer. *Bull Cancer.* 2006 Sep;93(9):961-72.
113. Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2006 Jan;12(2):192-8.

114. Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett.* 2008 Sep;268(2):177-86.
115. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jan;97(2):710-5.
116. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8681-6.
117. Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, Laird PW, Turla S, Cozen W, et al. Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2007 Oct;6:70.
118. Vallböhmer D, Brabender J, Yang D, Schneider PM, Metzger R, Danenberg KD, et al. DNA methyltransferases messenger RNA expression and aberrant methylation of CpG islands in non-small-cell lung cancer: association and prognostic value. *Clin Lung Cancer.* 2006 Jul;8(1):39-44.
119. Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V. TWIST is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar;367(2):235-41.
120. Wang J, Qin Y, Li B, Sun Z, Yang B. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1 in the tumor and serum of Chinese human primary hepatocellular carcinoma patients. *Clin Biochem.* 2006 Apr;39(4):344-8.
121. Wang X, Ling MT, Guan XY, Tsao SW, Cheung HW, Lee DT, et al. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene.* 2004 Jan;23(2):474-82.
122. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006 Jul;38(7):787-93.
123. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet.* 2005 Jan;365(9454):153-65.
124. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, Carlsson G, Gustavsson B. p16INK4a gene promoter hypermethylation in mucosa as a prognostic factor for patients with colorectal cancer. *Mol Med.* 2008 Jul-Aug;14(7-8):412-21.
125. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Gastrointestinal Consortium Panel. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology.* 2003 Feb;124(2):544-60.
126. Wong NA, Britton MP, Choi GS, Stanton TK, Bicknell DC, Wilding JL, Bodmer WF. Loss of CDX1 expression in colorectal carcinoma: promoter methylation, mutation, and loss of heterozygosity analyses of 37 cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan;101(2):574-9.
127. Wong NA, Wilding J, Bartlett S, Liu Y, Warren BF, Piris J, et al. CDX1 is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May;102(21):7565-70.
128. Woodson K, O'Reilly KJ, Hanson JC, Nelson D, Walk EL, Tangrea JA. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer. *J Urol.* 2008 Feb;179(2):508-11.
129. Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J, Jass JR. Methylation patterns define two types of hiperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut* 2004 Apr;53(4):573-80.

130. Xiang N, Zhao R, Song G, Zhong W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008 Nov;29(11):2175-81.
131. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999 Nov 11;402(6758):187-91.
132. Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004 Dec;10(23):3441-54.
133. Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new TWIST on tumor metastasis. *Cancer Res*. 2006 May 1;66(9):4549-52.
134. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004 Jun;117(7):927-39.
135. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol*. 2008 Mar;10(3):295-305.
136. Young J, Jenkins M, Parry S, Young B, Nancarrow D, English D, Giles G, Jass J. Serrated pathway colorectal cancer in the population: genetic consideration. *Gut*. 2007 Oct;56(10):1453-9.
137. Yuan Y, Qian ZR, Sano T, Asa SL, Yamada S, Kagawa N, et al. Reduction of GSTP1 expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2008 Jul;21(7):856-65.
138. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res*. 2001 Jan;61(1):249-55.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a frequência de hipermetilação de ilhas CpG na região promotora dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* em pacientes com carcinoma colorretal.

3.2 Específicos

1. Verificar a frequência de hipermetilação de *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* no tecido tumoral e na mucosa normal adjacente ao tumor em pacientes com CCR, comparando-as com as frequências obtidas na análise do cólon normal de pacientes sem CCR.
2. Avaliar a associação da hipermetilação de *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* com características como sexo e idade do paciente, localização, diferenciação e estadiamento tumorais.
3. Verificar se a hipermetilação destes três genes influencia a sobrevida global e a sobrevida livre de recidiva de pacientes com CCR.
4. Correlacionar a ocorrência de hipermetilação de *TWIST1* com sua expressão tecidual, empregando a técnica de imunohistoquímica.

CAPÍTULO 2

Artigo Original

TWIST1 Promoter Methylation in Primary Colorectal Cancer.

Submetido à European Journal of Surgical Oncology

TWIST1 Promoter Methylation in Primary Colorectal Cancer

Rúbia D. Ruppenthal ^{a, b, *}, Carmela Nicolini ^a, Andréa P. Damin ^a, Ana Paula Fernandes ^b, Rosalva Meurer ^a, Antônio F. Ferreira Filho ^c, Mario A. Rosito ^d, Daniel C. Damin ^d, Cláudio O. P. Alexandre ^a.

^a Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratory of Molecular Biology, Methodist University Center IPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Medical Oncology, Oncosinos - Hospital Regina, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^d Division of Coloproctology, Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author- Present address: Rua São Mateus 302 – 601, 91410 030, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: 55 51 9118-7399. Fax: 55 51 3303- 8732. E-mail address: rubiaruppenthal@hotmail.com.

Abstract

Aim: To investigate TWIST1 promoter methylation in patients with primary colorectal carcinoma and its correlation with prognostic factors and disease outcome.

Methods: Seventy-three patients with primary colorectal adenocarcinoma were studied. From each patient two tissue samples were collected: one sample of the tumor and one sample of normal colorectal tissue from an area located 15 cm away from the tumor. Samples of colorectal mucosa obtained from 30 individuals without malignant disease were also studied as control group. All tissues were analyzed through Methylation-specific PCR (MSP).

Results: TWIST1 hypermethylation was detected in colorectal specimens of 46 patients with cancer (63%), but in none of the tissues from the nonmalignant control group ($p < 0.001$). In cancer patients, TWIST1 hypermethylation was found in 52.1% of the tumors (38 of 73) as compared with 27.4% (20 of 73) of the matched non-cancerous tissues ($P=0.005$). TWIST1 hypermethylation was not correlated with prognostic predictors for the disease outcome, patients' overall survival (OS) and disease-free survival rates.

Conclusion: TWIST1 hypermethylation is present in the colon and rectum of most patients with colorectal carcinoma, indicating that this molecular alteration may be involved in the pathogenesis of the disease. The role of TWIST1 as biomarker in colorectal cancer is suggested.

Keywords: colorectal cancer, *TWIST1*, methylation.

Introduction

Hypermethylation of CpG dinucleotide “islands” located within promoter regions resulting in the silencing of tumor-suppressor genes is thought to be an important epigenetic mechanism for colorectal carcinogenesis [1,2]. The so-called CpG island methylator phenotype (CIMP) is observed in approximately 30% of colorectal cancer cases and is characterized by the simultaneous methylation of multiple CpG islands in tumor DNA. This phenotype is more frequently observed in tumors with proximal location, microsatellite instability, and normal p53 [3-5].

Colorectal carcinomas have been shown to develop through a stepwise progression of several genetic and epigenetic events taking place during the well-described “adenoma-carcinoma” sequence [6,7]. However, the identification of new molecular factors involved in progression of colorectal tumors is still a critical and necessary step towards better understanding of colorectal carcinogenesis and development of new anticancer strategies.

In this context, TWIST1 has recently emerged as a potential cancer biomarker [8-10]. It is a highly conserved transcription factor that belongs to the family of basic helix–loop–helix proteins [11]. TWIST1 is implicated in lineage-specific cellular differentiation during early embryonic development through the regulation of mesodermal patterning, morphogenesis and osteogenesis. In cancer development, TWIST1 is thought to function as a prometastatic oncogene [12]. Expression of TWIST1 protein counteracts the proapoptotic effects of N-MYC by repression of p19ARF and thereby hampers p53 function. In addition, it has been shown to induce angiogenesis and chromosomal instability [13].

TWIST1 is often overexpressed in malignant tumors, and it is usually associated with poor prognosis [14-16]. Elevated levels of TWIST1 mRNA have been observed in different types of cancer, such as breast cancer [9,17], diffuse-type gastric carcinomas [18,19], esophageal squamous cell carcinoma [20], and pancreatic cancer [21]. More recently, Valde's-Mora et al. [14] demonstrated that TWIST1 is significantly overexpressed in colorectal cancer samples as compared to normal colon mucosa, being significantly correlated with the presence of lymph node metastases. The authors propose TWIST1 as a new molecular marker of advanced malignancy and as a potential therapeutic target in colorectal cancer. To this date, however, TWIST1 methylation has not been studied in this type of cancer. Thus, the present study was designed to investigate TWIST1 promoter methylation in a large series of patients with primary colorectal carcinoma and its correlation with prognostic factors and disease outcome.

Patients and methods

Patients

Seventy-two patients with histologically confirmed primary colorectal adenocarcinoma were prospectively enrolled in the study. There were 36 males and 37 females (mean age 64.1 years, range 39 to 75). Patients with diagnosis of familial adenomatous polyposis, hereditary nonpolyposis colon cancer or inflammatory bowel disease were excluded from the study. Other inclusion criteria were no prior surgery, radiation or cytotoxic therapy for the colorectal adenocarcinoma.

Pretreatment assessment included a complete medical history and physical examination, carcinoembryonic antigen measurement, colonoscopic examination, computed tomography of abdomen and pelvis and chest radiograph. After the surgical resection and histological examination of the specimen, the patient's TNM stage was determined [22]. The distribution was as follows: 11 patients stage I (15.5%), 22 stage II (31.0%), 27 stage III (38%) and 11 stage IV (15.5%). Sixty-five tumors (90.5%) were histologically diagnosed as moderately differentiated and 7 (9.7%) were diagnosed as poorly differentiated adenocarcinomas.

As a nonmalignant control group, 30 patients submitted to colorectal resection for treatment of benign intestinal diseases were studied. This group included 14 males and 16 females (mean age 52.9 years, range 25 to 76) whose surgical specimens were histologically negative for malignant or premalignant lesions.

The present study was performed after approval by the Ethics and Scientific Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul. Informed consent was obtained from all patients before being enrolled in the study.

Tissues

All tissue samples were collected in the operating room by the surgeons directly involved in the study right after removal of the surgical specimens. Two tissue samples were collected from each patient with colorectal carcinoma: one sample of the tumor and one sample of non-cancerous colorectal tissue from an area located 15 cm proximally to the tumor. Tissue samples from the nonmalignant control group were obtained from a middle area of the resected colorectal specimen. All collected tissues were kept frozen until analysis.

DNA isolation, sodium bisulfite modification

DNA to MSP analyses was isolated from frozen material using QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Extracted DNA was submitted to chemical treatment with sodium bisulfite as previously reported [23]. In brief, 10 µg of DNA was denatured by NaOH and modified by sodium bisulfite treatment for 16 h at 55°C. DNA was then purified using Wizard DNA CleanUp System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions, desulphonated by incubating in a final concentration of 0.3M NaOH, precipitated with ethanol, resuspended in 20 µl water and stored at 20°C until MSP analysis. Bisulfite- modified DNA quantification was made in device GeneQuantII (Amersham PharmaciaBiotech UK Ltd. England).

Methylation-specific PCR (MSP)

Promoter methylation status of *TWIST1* was analyzed by MSP as described previously (Fackler, 2003). For each reaction, 1 µl of sodium bisulfite-modified DNA was added to 24 µl of reaction buffer [1.25 mM dNTP, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris (pH 8.8), 6.7 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol, 0,1% DMSO and 1,25 units Taq DNA Polimerase] containing 10 µmol of each primers pair to unmethylated (forward: 5' TTTGGATGGGGTTGTTATTGT 3'; reverse: 5'

CCTAACCCAAACAACCAACC 3') and methylated (forward: 5' TTTCGGATGGGGTTGTTATC 3'; reverse: 5' AAACGACCTAACCCGAACG 3') DNA sequences. These primers pairs were designed to amplify PCR products with 193 and 200 pb, respectively [Figure 1]. PCR reactions were 'hot started' at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72° C for 45 s, with a final extension cycle of 72° C for 5 min. The MSP products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide. CpG Universal methylated DNA (Qbiogene, Carlsbad, CA) was used as a positive control for methylated alleles and DNA from normal leucocytes were used as the negative control for unmethylated alleles. Negative controls without DNA were always included in all experiments.

Statistical analysis

Methylation status and clinicopathological parameters were investigated by Chi-square test or Fisher's exact test where appropriate. Overall survival (OS) was defined as the time interval from diagnosis to death from any cause or, for patients remaining alive, the time interval from diagnosis to the last follow-up. Disease-free survival (DFS) was defined as the time interval from surgery to the time of disease progression or recurrence, to the last follow-up, or to death occurrence from any cause. To determine the association between TWIST1 hypermethylation and OS and DFS, we used the Log-rank test of Kaplan–Meier. Statistical significance was accepted at the 5 percent level.

Results

In cancer patients, colorectal tissues were collected as paired samples of the tumor itself and of non-cancerous colorectal tissue from an area located 15 cm proximally to the tumor. TWIST1 hypermethylation was found in 52.1% of the tumors (38 of 73) as compared with 27.4% (20 of 73) of the matched proximal non-cancerous tissues ($P=0.005$). Either one of these results was statistically significant as compared with the analysis of the tissue samples from the nonmalignant control group, in which no hypermethylation was detected ($P < 0.001$). In 12 cancer patients (16.4%) TWIST1 hypermethylation was detected in both the tumor and the paired noncancerous colorectal tissue, in 26 cancer patients (35.6%) hypermethylation was detected only in the tumor and in 8 patients (11%) hypermethylation was found only in the non-cancerous tissue sample.

Clinical and pathological features of the colorectal cancer cases were analyzed according to their methylation status [Table 1]. TWIST1 hypermethylation was less frequently observed in tumors classified as TNM stage I as compared with tumors having more advanced stages ($P=0.047$). No significant differences were seen in TWIST1 hypermethylation with regard to age and gender of patients as well as with regard to degree of histological differentiation of the tumors.

After being submitted to surgical treatment, cancer patients were followed-up for a mean period of 40.23 month (range 1-63 months, data missing for 2 patients). During this period, 24 (33.3%) of the patients died (15 men and 9 women; mean age 67 ± 12 years) and 18 (25%) suffered disease relapse. The overall survival (OS) and the disease-free survival (DSF) rate of these patients after 4 years were 60.5% and 46.5%, respectively. Univariate analysis was used to evaluate the influence of

TWIST1 and other clinicopathological parameters on disease outcome [Table 2]. It was observed that the advanced cancer stages negatively influence both OS and DFS ($P < 0.0001$), while gender was correlated to reduction of DFS in men ($P = 0.024$). In contrast, detection of TWIST1 hypermethylation within the tumor did not influence the clinical course of these patients ($P = 0.60$).

Discussion

Colorectal cancer is one of the most common malignancies throughout the world with more than one million new cases diagnosed each year. In the process of colorectal carcinogenesis, a series of tumor suppressor genes such as *APC*, *p53*, and genes on chromosome 18q (*DCC*, *SMAD2*, and *DPC4/SMAD4*) are inactivated by mutations and chromosomal deletions [6]. A subset of colorectal tumors also shows a characteristic malignant phenotype which is associated with microsatellite instability (MSI) and inactivation of mismatch repair (MMR) genes such as *hMSH2* and *hMLH1* [24,25]. Recently, CpG island (CGI) hypermethylation has been identified as a potentially important molecular factor in CRC [2,3]. This alteration is usually associated with silencing of tumor-suppressor genes and absence of coding region mutation, serving as an alternative epigenetic mechanism in colorectal cancer development [26,27].

In this context, the evaluation of relevant methylated genes might eventually become useful in identifying new potential targets for molecular detection of colorectal carcinoma, as even small amounts of methylated sequences are readily detectable by MSP.

TWIST1 has recently emerged as a cancer biomarker [8,9,15]. It has been identified as an oncogene involved in different oncogenic pathways such as inhibition of the p53-dependent apoptotic route [12], alteration of cell–cell adhesion mediated by the E-cadherin [28] and induction of epithelial-mesenchymal transition [29], increasing cell survival and metastatic capability.

The present study is the first to investigate the TWIST1 methylation status in patients with primary colorectal carcinoma. We were able to detect TWIST1 hypermethylation

in colorectal specimens of 46 patients with cancer (63%), but in none of the tissues from the nonmalignant control group ($p < 0.001$). The absence of hypermethylation in the control group suggests that this alteration is not merely incidental in colorectal carcinomas, but might rather represent a potential cofactor in development of the disease. This observation, however, is somewhat confined by our sample size and needs further confirmation.

In patients with cancer, TWIST1 hypermethylation was more frequently seen in tumor tissues than in their paired nonneoplastic tissues ($p = 0.005$), suggesting that TWIST1 might be considered a Type-C agent with the potential to be used as an epigenetic cancer biomarker [3]. The Type-C genes are characteristically hypermethylated in preinvasive lesions and/or tumors and unmethylated in the mucosa of patients without cancer, being useful in early diagnosis of cancer. The presence of TWIST1 hypermethylation in a number of normal-appearing colorectal tissues obtained from patients with cancer suggests that this alteration might be an early event in the process of colorectal carcinogenesis.

Our results are in line with studies conducted in patients with breast cancer. Fackler et al. [8] used MSP to investigate the TWIST1 methylation status in 46 invasive mammary carcinomas, of which 19 were invasive lobular carcinomas (ILC) and 27 were invasive ductal carcinomas (IDC). The TWIST1 gene promoter was hypermethylated in ILC (3 of 19 cases, 16%) and in IDC (15 of 27 cases, 56%), but it was unmethylated in 8 reduction mammoplasty specimens used as nonneoplastic control tissues. Gort et al. [9] investigated TWIST1 promoter methylation in specimens from 76 patients with breast carcinoma. They showed that in the same patient healthy breast epithelium is less frequently methylated for TWIST1 compared with the malignant tissue it surrounds. According to the authors, these findings might

be explained by a selective advantage of breast epithelial cells with methylation of the TWIST1 promoter during breast carcinogenesis.

We found a lower prevalence of TWIST1 hypemethylation in tumors classified as TNM stage I as compared with more advanced-stage tumors. However, we did not find a clear correlation between methylation and other standard prognostic parameters in colorectal cancer, suggesting that TWIST1 methylation does not interfere with the clinical course of the disease. Furthermore, long-term follow-up of our patients failed to demonstrate an effect of TWIST1 hypemethylation in their OS and DFS.

Reports on breast cancer also failed to demonstrate a correlation between TWIST1 methylation and prognostic factors for cancer outcome [9,30]. Moreover, there seems to be no clear correlation between TWIST1 promoter methylation and TWIST1 protein or RNA expression [9]. This indicates that although TWIST1 CpG methylation is useful as an early biomarker in breast cancer diagnosis, there is no direct correlation with TWIST1 protein or RNA expression, which may be influenced by alternative compensatory molecular pathways. In colorectal cancer, the expression pattern of TWIST1 mRNA has been proposed as prognostic marker of advanced malignancy, being associated with the presence of lymph node metastases [14]. To date, however, the correlation between TWIST1 promoter methylation and TWIST1 protein expression has not been investigated in colorectal cancer.

In conclusion, we were able to provide evidence for an association of TWIST1 hypermethylation with colorectal cancer. Our data suggest that TWIST1 methylation might represent a new biomarker for this type of cancer. It should be pointed out, however, that this observation needs to be substantiated with additional studies analyzing a larger number of individuals and also the pathways involved this

molecular mechanism. Further studies are warranted to elucidate the role of TWIST1 in colorectal carcinogenesis.

Conflict of interest

All the authors disclose that there are no possible conflicts of interest.

References

1. Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000;910:140-53.
2. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004;84:884-93.
3. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8681-6.
4. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-93.
5. Teodoridis JM, Hardie C, Brown R. CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications. *Cancer Lett* 2008;268:177-86.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
7. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21-33.
8. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and TWIST in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003;107:970-5.
9. Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, et al. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:3325-30.
10. Kwok WK, Ling MT, Lee TW, et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 2005;65:5153-62.
11. Füchtbauer EM. Expression of M-TWIST during postimplantation development of the mouse. *Dev Dyn* 1995;204:316-22.
12. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, et al. TWIST is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:2207-17.
13. Mironchik Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, et al. TWIST1 overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:10801-9.
14. Elias MC, Tozer KR, Silber JR, et al. TWIST1 is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* 2005;7:824-37.
15. Valdés-Mora F, Gómez del Pulgar T, Bandrés E, et al. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009;16:78-87.
16. Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, et al. High TWIST1 expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol* 2006;37:431-8.
17. Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:235-41.
18. Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and TWIST1 in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002;161:1881-91.

19. Yan-Qi Z, Xue-Yan G, Shuang H, et al. Expression and significance of TWIST basic helix-loop-helix protein over-expression in gastric cancer. *Pathology*. 2007;39:470-5.
20. Yuen HF, Chan YP, Wong ML, et al. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J Clin Pathol* 2007;60:510-4.
21. Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, et al. Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *Int J Cancer* 2007;120:1634-40.
22. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Manual for Staging of Cancer*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1988.
23. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
24. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 2002;89:845-60.
25. Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-40.
26. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006;6:107-16.
27. Frigola J, Solé X, Paz MF, et al. Differential DNA hypermethylation and hypomethylation signatures in colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2005;14:319-26.
28. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. TWIST1, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
29. Yang J, Mani SA, Weinberg RA. Exploring a new TWIST1 on tumor metastasis. *Cancer Res* 2006;66:4549-52.
30. Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors snail, slug, and TWIST1 and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12:488-96.

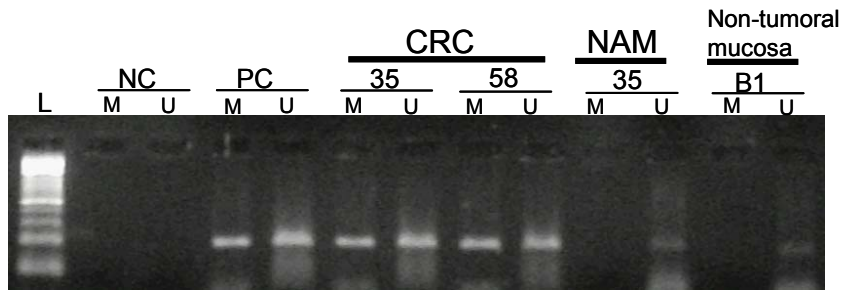


Figure 1. MSP analysis of *TWIST1* hypermethylation in colorectal cancer tissue (CRC), in paired normal-appearing mucosa (NAM) and in non-tumoral mucosa (controls). A visible PCR product in lanes M shows the presence of methylated genes (methylated, 200pb), while amplicons in lanes U show the absence of methylation (unmethylated, 193pb). L, size marker, 100-pb DNA ladder; NC, negative controls; PC, positive controls. 35, 58 and B1= sample identification.

Table 1.

Association of *TWIST1* hypermethylation status and the main clinicopathological features in 73 CRC patients.

Feature ^a	n (%)	<i>TWIST1</i> hypermethylation status			
		Colorectal carcinoma tissue		Paired nonneoplastic tissues	
		Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>
<i>All patients</i>	73	38		20	
<i>Age (yrs)</i>					
≥50	59	33	NS	17	NS
<50	13	05/		03	
<i>Gender</i>					
Female	36	20	NS	11	NS
Male	37	18		09	
<i>Localization</i>					
Right colon	13	08		0	
Left colon	20	10	NS	07	0.042
Rectum	40	20		13	
<i>Differentiation</i>					
Well /Moderate	65	31	NS	17	NS
Poor	7	06		03	
<i>TNM stage</i>					
I	11	02		02	
II	23	11	0.047	06	NS
III	27	18		10)	
IV	11	07		02	

^aData missing for age, tumor differentiation and TNM tumor stage for one patient.

Table 2.

Impact of clinicopathological parameters and *TWIST1* hypermethylation on overall and disease-free survival in CRC patients.

Feature	Overall survival		Disease-free survival	
	Median (months) ± standard deviation	<i>P</i> ^a	Median (months) ± standard deviation	<i>P</i> ^a
<i>Age (yrs)</i>				
≥50	46.7 ± 2.96	NS	48.7 ± 3.32	NS
<50	52.5 ± 4.16		46.0 ± 5.61	
<i>Gender</i>				
Female	49.3 ± 3.45	NS	51.9 ± 3.43	0.024
Male	45.9 ± 3.60		42.8 ± 4.45	
<i>Localization</i>				
Right colon	47.8 ± 2.84	NS	49.4 ± 3.16	NS
Left colon/rectum	47.9 ± 5.11		43.8 ± 6.26	
<i>Differentiation</i>				
Well/moderate	49.0 ± 2.67	NS	50.0 ± 3.96	NS
Poor	40.8 ± 8.61		36.2 ± 9.94	
<i>TNM stage</i>				
I	55.7 ± 1.21	<0.0001	52.5 ± 2.24	0.018
II	56.2 ± 3.06		57.7 ± 2.89	
III	45.1 ± 4.17		37.1 ± 5.37	
IV	23.4 ± 5.73		-	
<i>TWIST1 methylation in colorectal cancer tissue</i>				
Unmethylated	47.7 ± 3.56	NS	47.7 ± 3.84	NS
Methylated	47.3 ± 3.45		47.9 ± 4.15	
<i>TWIST1 methylation in paired non-neoplastic tissue</i>				
Unmethylated	49.7 ± 3.02	NS	52.3 ± 3.10	NS
Methylated	44.2 ± 4.48		39.8 ± 5.53	

^a Log-rank test

CAPÍTULO 3

Letter to the Editor

*TWIST1 Methylation and Immunohistochemical Expression in
Colorectal Cancer.*

Submetido à Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.

TWIST1 Methylation and Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer.

To the Editors: We read with great interest the article “Methylation of the TWIST1 Promoter, TWIST1 mRNA Levels, and Immunohistochemical Expression of TWIST1 in Breast Cancer” (1). In this paper, Gort et al. analyzed the methylation status as well as the mRNA and the percentage of cells expressing TWIST1 in normal breast tissue and breast carcinomas. TWIST1 promoter methylation was significantly more prevalent in malignant compared with healthy breast tissue. The percentage of cells expressing TWIST1 was also greater in breast carcinomas. In contrast, there was no correlation between TWIST1 hypermethylation and TWIST1 protein or RNA expression. According to the authors, although TWIST1 CpG methylation can be considered as a breast cancer biomarker, there is no correlation between TWIST1 hypermethylation and TWIST1 tumoral expression.

We congratulate the authors for contributing to the literature on this subject and agree with their conclusion. TWIST1 has recently emerged as an oncogene involved in several cancer pathways, appearing as a potential biomarker for different malignancies. Currently, our group is simultaneously investigating the TWIST1 methylation status through methylation-specific PCR and TWIST1 immunohistochemical expression in samples of colorectal carcinoma and paired normal colorectal mucosa obtained from the same patient. Our preliminary results, after analyzing 20 patients, are in line with the study by Gort et al. (1). Hypermethylation of TWIST1 gene was detected in 13 carcinomas and 10 had high immunohistochemical expression and hypermethylation of TWIST1 gene concomitantly detected. When positively stained, the cells had the TWIST1 expression restricted to the cytoplasm. Furthermore, some of the nonmalignant samples also presented high TWIST1 expression, as previously reported in breast

cancer (1, 2). In contrast to what we observed in the TWIST1 methylation analysis, we found similar TWIST1 immunohistochemical expressions in carcinomas compared with their paired nonmalignant colorectal tissues ($P=0.37$, McNemar Test). In colorectal cancer, the expression of TWIST1 mRNA has been proposed as prognostic marker of advanced malignancy, being associated with the presence of nodal metastases (3). To date, however, the correlation between TWIST1 hypermethylation and TWIST1 protein expression has not been investigated in colorectal carcinogenesis. So far, our findings indicate that there is no correlation between TWIST1 hypermethylation and this gene's expression in colorectal carcinomas. TWIST1 hypermethylation seems to be an early event in human carcinogenesis, which precedes compensatory TWIST1 overexpression. These molecular mechanisms should be addressed in *in vitro* models to further elucidate the role of TWIST1 gene in colorectal cancer. Further studies are warranted.

References

1. Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, et al. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:3325-30.
2. Kyo S, Sakaguchi J, Ohno S, et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Hum Pathol.* 2006;37:431-8.
3. Valdés-Mora F, Gómez del Pulgar T, Bandrés E, et al. TWIST1 overexpression is associated with nodal invasion and male sex in primary colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2009;16:78-87.

Authors and affiliations

Rúbia Denise Ruppenthal, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Adriana Roehe Department of Patology , Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Cláudio Osmar Pereira Alexandre, Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Daniel C. Damin *, Division of Coloproctology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author- Present address: Avenida Lageado 1099 - 202, 90 460 110 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: 55 51 9602 0442; fax: 55 51 3328 5168.

E-mail address: damin@terra.com.br.

CAPÍTULO 4

Artigo Original

CpG island hypermethylation of CDX1 and GSTP1 as a marker in diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Submetido à Cancer Detection and Prevention.

CpG island hypermethylation of CDX1 and GSTP1 as a marker in diagnosis and prognosis of colorectal cancer.

Rúbia D. Ruppenthal MSc^{a,b,*}, Carmela Nicollini BS^a, Andréa P. Damin PhD^a,
Vanessa G. Schneider BS^b, Antônio F. Ferreira Filho PhD^c, Mario A. Rosito MD^d,
Daniel C. Damin PhD^d, Cláudio O. P. Alexandre PhD^a.

^a Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratory of Molecular Biology, Methodist University Center IPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Medical Oncology, Oncosinos - Regina Hospital, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^d Division of Coloproctology, Department of Surgery, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author

Rúbia D. Ruppenthal

Address: Rua São Mateus 302 – 601, 91410 030, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel: 55 51 9118-7399

Fax: 55 51 3303-8732

E-mail: rubiarruppenthal@hotmail.com.

Short title: Hipermethylation of *CDX1* and *GSTP1* in CRC.

Abstract

CDX1 and *GSTP1* may be early critical determinants of colorectal carcinogenesis. We analyzed the methylation status of *CDX1* and *GSTP1* in colorectal cancer (CRC) and in macroscopically normal-appearing colorectal mucosa (NAM) from 73 patients with CRC. We also analyzed normal colorectal mucosa from 30 patients without CRC as a control group. The hypermethylation rate of *CDX1* and *GSTP1* was 91.3 and 49.3% in colorectal cancer and 94.2 and 47.9% in paired-normal mucosa, not significantly differing between these tissues ($P=0.311$ and $P=0.103$ for *CDX1* and *GSTP1* respectively). We also detected *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation in the mucosa of the controls without cancer, however, at significantly lower rates than in CRC patients. *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation did not differ significantly based on gender, age, or tumor location, differentiation and TNM stage, and also did not influence overall survival and disease-free survival. Our data suggests that *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation occurs in pre-tumoral or initial stages of colorectal carcinogenesis but their use in early detection of colorectal cancer should be further investigated in the future.

Keywords: Colorectal cancer, DNA hypermethylation, *CDX1*, *GSTP1*.

Introduction

Malignant tumors of the colon and rectum represent the second most prevalent neoplasia in the world, with an estimate of 2.4 million cases in the last five years [1]. Colorectal cancer is a disease that can be cured and even prevented when efficient measures are applied [2]. In advanced cases, however, surgical treatment is often ineffective [3]. In this context, advances in the genetic and epigenetic understanding of CRC have revealed changes in oncogenes and tumor suppressing genes that can potentially be used as markers in the identification of patients at increased risk of developing CRC and in the prediction of its clinical evolution [4, 5].

DNA hypermethylation – an epigenetic alteration - has been investigated as a potential molecular marker in CRC [5]. Hypermethylation of cytosine residues in CpG-rich regions (CpG island) within the gene promoter is recognized as an important mechanism of oncogene activation and tumor suppressor gene inactivation in CRC [6].

The Caudal-type homeobox 1 genes (*CDX1*) and glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) code proteins that have been related to the development and evolution of the CRC [7-10]. The expression of these two genes proved to be modulated, at least in part, through hypermethylation [11-14], which makes them potential molecular markers to be investigated in CRC. The purpose of this study was to analyze the hypermethylation of *CDX1* and *GSTP1* in a large series of patients with CRC, also evaluating its influence on the clinicopathological parameters and disease outcome.

Materials and Methods

Patients and tissue samples

Surgically resected specimens from colorectal carcinoma (CRC) and macroscopically normal-appearing mucosa (NAM) were obtained from 73 patients with primary colorectal adenocarcinoma submitted to surgical resection at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, between Oct 2003 and May 2005. The normal tissue samples were obtained from areas approximately 15 cm from the primary tumors. In this group, there were 36 males and 37 females (mean age 64.1 years, range 39 to 75). After the surgical resection and histological examination of the specimen, the patient's TNM stage was determined [15]. The distribution was as follows: 11 patients classified as stage I (15.5%), 22 as stage II (31.0%), 27 as stage III (38%) and 11 as stage IV (15.5%). Clinicopathological parameters from these patients are presented in Table 1.

As a nonmalignant control group, 30 patients submitted to colorectal resection for treatment of benign intestinal diseases were studied. This group included 14 males and 16 females (mean age 52.1 years, range 35 to 73) whose surgical specimens were histologically negative for malignant or pre-malignant lesions. Of the 30 tissue samples analyzed, seven (23.3%) were obtained from right-sided colon, 11 (36.7) from left-sided colon and 12 (40%) from the rectum.

The present study was performed after approval by the Ethics and Scientific Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul. Informed consent was obtained from all patients before being enrolled in the study.

DNA isolation, sodium bisulfite modification.

DNA to MSP analyses was isolated from frozen material using QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany). Extracted DNAs were submitted to chemical treatment with sodium bisulfite as previously reported [16]. Briefly, 10 µg of DNA was denatured by NaOH and modified by sodium bisulfite treatment for 16 h at 55°C. DNA was then purified using Wizard DNA CleanUp System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions, desulphonated by incubating in a final concentration of 0.3M NaOH, precipitated with ethanol, resuspended in 20 µl water and stored at 20°C until MSP analysis. Bisulfite- modified DNA quantification was made in device GeneQuantII (Amersham PharmaciaBiotech UK Ltd. England).

Methylation-specific PCR (MSP).

Promoter methylation status of *CDX1* and *GSTP1* genes were analyzed by MSP as described previously [11, 17]. For each reaction, 1 µl of sodium bisulfite-modified DNA was added to 24 µl of reaction buffer [1.25 mM dNTP, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris (pH 8.8), 6.7 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.1% DMSO and 1.25 units Taq DNA Polymerase] containing 10 µmol of each primers pair to unmethylated and methylated DNA sequences. Primers for *CDX1* were 5' TGATTGGGTTGTTGTTTATGG 3' (forward) and 5' TACCACCACCACCTCCAA 3' (reverse) for the unmethylated reactions and 5' CGATTGGGTCGTCGTTTA 3' (forward) and 5'CCGCATCCACTCGTAAAA 3'(reverse) for the methylated reactions (Xu *et al.*, 2004), designed to amplify 233 and 202 pb, respectively. Primers for *GSTP1* were 5' GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT 3' (forward) and 5'CCACCCAATACTAAATCACAACA 3' (reverse) for the unmethylated reactions and 5' TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC 3' (forward) and 5'GCCCCAATACTAAATCACGACG 3' (reverse) for the methylated reactions

(Zochbauer-Muller, 2001), and amplify 90 and 100 pb, respectively. PCR reactions were 'hot started' at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 57°C (*CDX1*) or 59°C (*GSTP1*) for 30 s, 72° C for 45 s, with a final extension cycle of 72° C for 5 min. The MSP products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels containing ethidium bromide. CpG Universal methylated DNA (Qbiogene, Carlsbad, CA) was used as a positive control for methylated alleles and DNA from normal leucocytes were used as the negative control for unmethylated alleles. Negative controls without DNA were always included in all experiments.

Statistical analysis.

Methylation status and clinicopathological parameters were investigated by Chi-square test or Fisher's exact test where appropriate. McNemar test were used to compare paired data. Overall survival (OS) was defined as the time interval from diagnosis to death from any cause or, for patients remaining alive, the time interval from diagnosis to the last follow-up. Disease-free survival (DFS) was defined as the time interval from surgery to the time of disease progression or recurrence, to the last follow-up, or to death occurrence from any cause. To determine the association between hypermethylation of individual genes and OS and DFS of patients, we used the Log-rank test of Kaplan–Meier. In all tests, a two-sided P value \leq than 0.05 were considered as statistically significant.

Results

The use of specific primers for methylated or unmethylated promoter regions allowed amplification of fragments according to the size for each gene [Fig.1]. All the samples had PCR products corresponding to the unmethylated DNA sequences (U), even when the band corresponding to the methylated DNA (M) was also present. This result was expected, since the selection of tumor tissues was done macroscopically, possibly containing, therefore, a mixture of DNA obtained from neoplastic cells and inflammatory or stromal cells. Furthermore, some loci can be heterozygotes for methylation and thus have one of the unmethylated alleles.

CDX1 and GSTP1 hypermethylation in CRC, NAM and non-tumoral mucosa.

Among patients with CRC, 91.3 and 49.3% had hypermethylation of *CDX1* and *GSTP1* in CRC tissue and 94.2 and 47.9% in the normal-appearing mucosa, respectively. The rate of hypermethylation did not differ statistically between the tumor and normal-appearing mucosa ($P=0.311$ and $P=0.103$ for *CDX1* and *GSTP1*, respectively, Fisher's Exact test). Through analysis of hypermethylation in paired samples (obtained from the same patient), the rates of hypermethylation also did not vary between the tumor and normal-appearing mucosa ($P=0.73$ and $P=0.98$ for *CDX1* and *GSTP1* respectively, McNemar test). These findings show that in patients with CRC, the *CDX1* and *GSTP1* have high hypermethylation rates in the mucosa that still do not show visible morphological changes.

In patients without CRC, the methylation rate in the normal mucosa was 70% (21/30) and 10% (3/30) for *CDX1* and *GSTP*, respectively. In spite of this findings, the hypermethylation rate of *CDX1* and *GSTP1* is significantly lower in the normal

mucosa of patients without CRC as compared with the CRC tissues ($P=0.012$ and $P=0.0001$ respectively) and with the paired normal-appearing mucosa ($P=0.002$ and $P=0.00016$ respectively, Fisher's Exact test).

We also analyzed possible associations between *GSTP1* and *CDX1* hypermethylation with the main clinicopathological parameters obtained from patients with CRC. The hypermethylation rates for *CDX1* and *GSTP1* are neither correlated with age or gender of the patients, nor with tumor location, differentiation or clinical staging (Table 1).

Survival analysis

The mean follow-up of CRC patients was 40.23 months (range, 1-63 months, data missing for 2 patients). During this period, 24 (33.3%) of the patients died (15 men and 9 women; mean age 67 ± 12 y). Overall survival (OS) and disease-free survival (DSF) were 60.5% and 46.5%, respectively, during a four-year follow-up.

The univariate analysis was used to evaluate the impact of *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation and other clinicopathological parameters on the OS and DFS in patients with CRC. As expected, it was observed that advanced tumor stages are negatively correlated both OS and DFS (Table 2, $P < 0.0001$, Log Rank Test), while gender is related to reduction of DFS in men ($P=0.024$). However, frequent *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation in both the tumoral tissue and normal-appearing mucosa do not seem to directly influence survival of these patients (Table 2, P value not significant for all the associations, Log-rank test).

Discussion

We reported here that *CDX1* and *GSTP1* were frequently hypermethylated in CRC tissue, event that could play a role in CRC carcinogenesis. Colorectal carcinomas have been shown to develop through a stepwise progression of several genetic and epigenetic events taking place during the well-described “adenoma-carcinoma” sequence [18, 19]. However, the identification of new molecular factors involved in progression of colorectal tumors is still a critical and necessary step towards better understanding of colorectal carcinogenesis and development of new anticancer strategies.

CDX1 encodes a transcription factor required for the expression of genes that regulate the proliferation and differentiation of the intestinal epithelium [20]. Reduction in the *CDX1* expression in CRC was associated with hypermethylation [11, 12, 21, 22]. Our findings confirm that the *CDX1* gene is hypermethylated with high rate in the tumor (91.3%) and in the normal-appearing mucosa (94.2%) obtained from patients with CRC, similar to the findings previously reported [11]. However, *CDX1* hypermethylation is not cancer-specific, and could also be observed in 70% of patients without CRC, implying that *CDX1* may have a physiologic role in normal colorectal epithelium. However, when comparing normal and malignant tissues, *CDX1* hypermethylation was significantly higher in malignant tissue, in accordance with its role in promoting colorectal cancer.

The *GSTP1* gene encodes the detoxifying isoenzyme called GST π (glutathione S transferase pi) [23], which metabolizes a wide range of chemical agents and therefore protects the DNA and other important biomolecules from the damage caused by chemotherapeutic, carcinogenic agents and environmental pollutants [13].

Studies have shown that loss or reduction in *GSTP1* activities due to genetic changes, like deletions [9] and polymorphisms [10], or epigenetic changes, like hypermethylation [5, 13, 14, 24] increase the action of these carcinogens on the colon mucosa, thus favoring development of CRC. We reported here that *GSTP1* hypermethylation occurs in 49% of the patients with CRC and in 10% of patients without CRC. These results differs from the range of 4 to 16% of *GSTP1* hypermethylation observed in colorectal cancer tissue [5, 13, 14] and in normal colorectal epithelium [5, 24].

GSTP1 and *CDX1* hypermethylation could represent an early event in the carcinogenesis of CRC, as reported previously [21, 25]. To our knowledge, this is the first study that reports a high hypermethylation rate (47%) of *GSTP1* in the colorectal mucosa surrounding the tumor, very similar to frequencies observed in CRC tissue (49%). The result of present and previous studies [26, 27] shows that use of the normal-appearing mucosa of patients with CRC as control in methylation studies must be questioned. The colorectal mucosa of CRC patients differs from that of healthy individuals at DNA, RNA and protein level and which gives it a premalignant behavior, metastatic and prognostic potential [28, 29]. Despite *CDX1* and *GSTP1* being methylated in the normal colon, indicating a possible physiological role, the methylation of these genes is significantly increased in normal-appearing mucosa. Thus, we suggest that the hypermethylation of these genes is an early event in CRC carcinogenesis, related to the initiation and with participation in preneoplastic phases in the CRC.

We did not detect association between *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation with clinicopathological parameters or with increased risk of death and relapse in CRC patients. These associations had never been evaluated before in CRC patients,

mainly in relation to survival. However, in other types of tumors, some studies show divergence with regard to the influence of *GSTP1* on the prognosis. In breast [30, 31] prostate [32] and pituitary [33] tumors, *GSTP1* hypermethylation seems to influence the prognosis negatively. While in lymphomas, it is related to a higher survival and response to the treatment [34]. It is to be expected, however, that the isolated action of a biomolecular, or even immunohistochemical, marker does not have significant changes on the prognosis, considering the complex multifactorial origin of the oncogenic process. The survival receives influence from various internal and external factors that regulate the life time by independent and, to most of them, unknown pathways.

In conclusion, this study indicated that hypermethylation of *CDX1* and *GSTP1* plays a role in CRC carcinogenesis, although their uses as molecular marker are limited. We therefore suggest that their applicability as markers could further investigated in studies that include more subjects or that could show their association to different genes.

References

1. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al. CONCORD Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol* 2008;9:730-56.
2. Yamashita K, Watanabe M. Clinical significance of tumor markers and an emerging perspective on colorectal cancer. *Cancer Sci* 2009;100:195-9
3. Scheer MG, Sloots CE, van der Wilt GJ, Ruers TJ. Management of patients with asymptomatic colorectal cancer and synchronous irresectable metastases. *Ann Oncol* 2008;19:1829-35.
4. Bodmer WF. Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet* 2006;5:391-6.
5. Lee S, Hwang KS, Lee HJ, Kim JS, Kang GH. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in colorectal neoplasia. *Lab Invest* 2004;84:884-93.
6. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:988-93.
7. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN. Key role of the *Cdx2* homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 1997;139:1553-65.
8. Guo RJ, Huang E, Ezaki T, Patel N, Sinclair K, Wu J, et al. *CDX1* inhibits human colon cancer cell proliferation by reducing beta-catenin/T-cell factor transcriptional activity. *J Biol Chem* 2004;279:36865-75.
9. Henderson CJ, Smith AG, Ure J, Brown K, Bacon EJ, Wolf CR. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5275-80.
10. Ateş NA, Tamer L, Ateş C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet* 2005;43:149-63.
11. Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, et al. Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:3441-54.
12. Pillozzi E, Onelli MR, Ziparo V, Mercantini P, Ruco L. *CDX1* expression is reduced in colorectal carcinoma and is associated with promoter hypermethylation. *J Pathol* 2004;204:289-95.
13. Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res* 1998;58:4515-8.
14. Kim HC, Roh SA, Ga IH, Kim JS, Yu CS, Kim JC. CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2005;20:1920-6.
15. American Joint Committee on Cancer (AJCC). Manual for Staging of Cancer. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott; 1988.
16. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-6.
17. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61:249-55.

18. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
19. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21-33.
20. Freund JN, Domon-Dell C, Kedingler M, Duluc I. The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* 1998;76:957-69.
21. Suh ER, Ha CS, Rankin EB, Toyota M, Traber PG. DNA methylation down-regulates *CDX1* gene expression in colorectal cancer cell lines. *J Biol Chem* 2002;277:35795-800.
22. Wong NA, Wilding J, Bartlett S, Liu Y, Warren BF, Piris J, et al. *CDX1* is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7565-70.
23. Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* 1988;23:283-337.
24. Bai AH, Tong JH, To KF, Chan MW, Man EP, Lo KW, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in the progression of colorectal neoplasia. *Int J Cancer* 2004;112:846-53.
25. Lee JS. *GSTP1* promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Arch* 2007;450:637-42.
26. Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Willén R, Carlsson G, Spears CP, et al. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:6012-9.
27. Wettergren Y, Odin E, Nilsson S, Carlsson G, Gustavsson B. p16INK4a gene promoter hypermethylation in mucosa as a prognostic factor for patients with colorectal cancer. *Mol Med* 2008;14:412-21.
28. Kuniyasu H, Oue N, Shigeishi H, Ito R, Kato Y, Yokozaki H, et al. Prospective study of Ki-67 labeling index in the mucosa adjacent to cancer as a marker for colorectal cancer metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:543-8.
29. Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, Tse C, Brault D, Chiappini F, et al. Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene* 2005;24:6155-64.
30. Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, Akazawa K, Maruyama N, Taguchi T, et al. Association of *GSTP1* expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. *Eur J Surg Oncol* 2008;34:734-8.
31. Sunami E, Shinozaki M, Sim MS, Nguyen SL, Vu AT, Giuliano AE, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast Cancer Res* 2008;10:R46.
32. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate* 2008;68:42-9.
33. Yuan Y, Qian ZR, Sano T, Asa SL, Yamada S, Kagawa N, et al. Reduction of *GSTP1* expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol* 2008;21:856-65.
34. Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S, et al. Correlation between promoter hypermethylation of *GSTP1* and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2007;86:557-64.

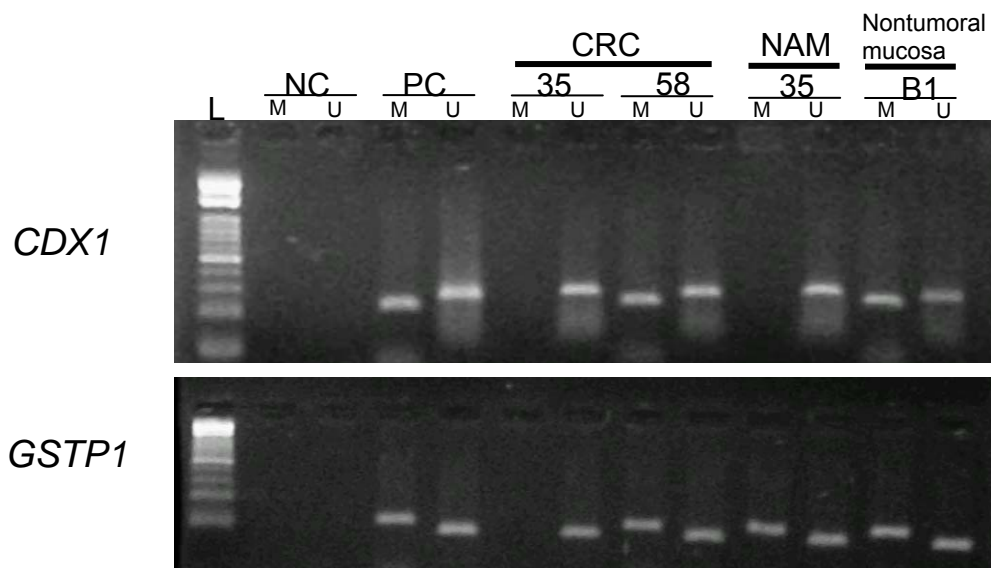


Figure 1. MSP analysis of *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation in colorectal cancer tissue (CRC) and paired normal-appearing mucosa (NAM) from CRC patients and nontumoral mucosa from patients without CRC (controls). A PCR product visible in lanes M shows the presence of methylated alleles (202 pb to *CDX1* and 100 pb to *GSTP1*), while amplicons in lanes U show the absence of methylation (233 pb for *CDX1* and 90 pb for *GSTP1*). L, size marker, 100-pb DNA ladder; NC, negative controls; PC, positive controls. 35, 58 e B1= sample identification.

Table 1
Association of *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation status and main clinicopathological features in 73 CRC patients.

Feature ^a	n (%)	Hypermethylation frequency					
		NAM			CRC		
		<i>CDX1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>CDX1+GSTP1</i>	<i>CDX1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>CDX1+GSTP1</i>
<i>All patients</i>	73	65	35	31	63	36	32
<i>Age (yrs)</i>							
≥50	59	54	27	24	52	27	24
<50	13	12	08	07	11	09	08
<i>P</i>		0.463	0.235	0.502	0.999	0.22	0.245
<i>Gender</i>							
Female	37	33	22	18	32	16	15
Male	36	34	13	13	32	20	17
<i>P</i>		0.614	0.062	0.332	1	0.353	0.757
<i>Localization</i>							
Right colon	13	12	06	05	13	04	05
Left colon	20	19	07	06	17	08	07
Rectum	40	36	22	20	34	24	20
<i>P</i>		0.938	0.34	0.438	0.513	0.116	0.678
<i>Differentiation</i>							
Well/moderate	65	60	31	27	56	32	28
Poor	07	06	04	04	07	03	03
<i>P</i>		0.693	0.707	0.727	0.473	0.532	0.381
<i>TNM stage</i>							
I	11	10	05	04	08	07	06
II	23	19	09	07	20	09	10
III	27	26	14	14	23	13	09
IV	11	10	06	05	11	06	06
<i>P</i>		0.179	0.844	0.668	0.385	0.646	0.478

NAM, normal-appearing mucosa; CRC, colorectal cancer tissue.

^a Data missing for age, differentiation and for TNM tumor stage for one patient.

Table 2
Impact of clinicopathological parameters and *CDX1* and *GSTP1* hypermethylation on overall and disease-free survival in patients with CRC.

Feature	Overall survival		Disease-free survival	
	Median (months) ± standard deviation	<i>P</i> ^a	Median (months) ± standard deviation	<i>P</i> ^a
<i>Age (yrs)</i>				
≥50	46.7 ± 2.96	0.16	48.65 ± 3.32	0.8
<50	52.5 ± 4.16		46.01 ± 5.61	
<i>Gender</i>				
Female	49.3 ± 3.45	0.12	51.92 ± 3.43	0.024
Male	45.9 ± 3.60		42.82 ± 4.45	
<i>Localization</i>				
Right colon	47.8 ± 2.84	0.44	49.35 ± 3.16	0.89
Left colon/rectum	47.9 ± 5.11		43.75 ± 6.26	
<i>Differentiation</i>				
Well/moderate	49.0 ± 2.67	0.49	50.02 ± 3.96	0.23
Poor	40.8 ± 8.61		36.16 ± 9.94	
<i>TNM tumor stage</i>				
I	55.7 ± 1.21	<0.0001	52.5 ± 2.24	0.018
II	56.2 ± 3.06		57.7 ± 2.89	
III	45.1 ± 4.17		37.1 ± 5.37	
IV	23.4 ± 5.73		NA	
<i>CDX1 hypermethylation in CRC</i>				
Unmethylated	46.8 ± 2.77	0.73	39.8 ± 8.87	0.26
Methylated	52.33 ± 6.51		48.36 ± 3.09	
<i>CDX1 hypermethylation in NAM</i>				
Unmethylated	49.8 ± 11.8	0.81	49.7 ± 11.5	0.9
Methylated	48.2 ± 2.58		48.7 ± 2.93	
<i>GSTP1 hypermethylation in CRC</i>				
Unmethylated	50.04 ± 3.67	0.32	51.07 ± 4.11	0.19
Methylated	45.82 ± 3.37		44.98 ± 3.85	
<i>GSTP1 hypermethylation in NAM</i>				
Unmethylated	47. ± 3.95	0.76	49.2 ± 3.78	0.83
Methylated	47,6 ± 3,61		46,6 ± 4,10	

NAM, normal-appearing mucosa; CRC, colorectal cancer tissue, NA, not applicable.

^a Log-rank test

5. CONCLUSÕES FINAIS

Relatamos aqui importantes achados sobre a frequência de hipermetilação de ilhas CpG na região promotora dos genes *CDX1*, *GSTP1* e *TWIST1* e sua influência sobre a carcinogênese e evolução clínica do CCR. Para tanto, comparamos a frequência de metilação observada em biópsias obtidas de pacientes com CCR com a da mucosa normal de pacientes saudáveis. Além disso, a hipermetilação destes genes foi avaliada quanto à associação com parâmetros clinicopatológicos, bem como pela capacidade de influenciar o prognóstico dos pacientes com CCR.

Abaixo, apresentamos de forma sumarizada as principais conclusões deste trabalho.

- 1) *A hipermetilação de CDX1, GSTP1 e TWIST1 é um mecanismo biológico de controle de expressão gênica importante na fisiopatogenia do CCR, pois ocorre com elevada frequência em pacientes com este tipo de tumor em relação aos pacientes sem câncer. Para todos os genes, foi demonstrada elevação estatisticamente significativa da frequência de hipermetilação nas biópsias obtidas dos pacientes com CCR.*
- 2) *A mucosa aparentemente normal obtida de pacientes com CCR apresenta alterações epigenéticas significativas. Por este motivo, sua utilização como tecido “controle” em estudos de hipermetilação não seria adequada. Para todos os genes, foi demonstrada elevação significativa da frequência de hipermetilação na mucosa aparentemente normal de pacientes com CCR quando comparada à mucosa normal de pacientes sem CCR.*
- 3) *A hipermetilação de CDX1, GSTP1 e TWIST1 parece ser um evento precoce na patogênese do CCR. Esta afirmação parte do achado de que, para os três*

genes, foi detectada elevação na frequência de metilação na mucosa aparentemente normal de pacientes com CCR.

- 4) *A metilação de CDX1 e GSTP1 parece não estar associada a características como sexo e idade do pacientes ou localização, diferenciação e estadiamento tumoral. Já a hipermetilação de TWIST1 é mais freqüente em tumores com estadiamento II, III e IV, o que indica um possível envolvimento de TWIST1 não somente em fases iniciais, mas também na progressão e metástase tumoral.*
- 5) *A hipermetilação dos três genes aqui analisados não influencia a sobrevida global e a sobrevida livre de recidiva dos pacientes com CCR (tempo de seguimento médio: 40,23 meses).*
- 6) *Através de análise imunoistoquímica, foi possível concluir que a hipermetilação não está diretamente relacionada à perda da expressão proteica tecidual de TWIST1. Grande parte das biópsias nas quais se detectou hipermetilação de TWIST1 apresentaram concomitante elevada expressão proteica, o que indica que estes mecanismos não estão inversamente relacionados no carcinoma colorretal. Este achado sugere que outros mecanismos podem se sobrepor à hipermetilação no controle de expressão de TWIST1.*

ANEXO 1

Detalhamento de resultados não incluídos nos manuscritos.

1. Análise imunoistoquímica para detecção da proteína TWIST1 em amostras de tumor colorretal.

1.1 Pacientes e Métodos

Foram incluídos neste estudo 20 pacientes com diagnóstico laboratorial de carcinoma colorretal submetidos à ressecção cirúrgica, no período de junho de 2007 a julho de 2008, pela equipe de Coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. De cada pacientes foram obtidas duas amostras de tecido, uma de tecido tumoral (T) e outra da mucosa macroscopicamente normal adjacente ao tumor (adjT). As amostras adjT foram coletadas de uma área localizada a pelo menos 15 cm do tumor. Após a coleta, as amostras foram imediatamente imersas em formalina 10% e enviadas ao Serviço de Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) para a análise imunoistoquímica (IHQ).

1.2 Análise imunoistoquímica

As biópsias foram submetidas à desidratação em álcool, imersão em xilol e o emblocamento em parafina. Para observar a integridade dos tecidos, uma secção de 3 micras de cada biópsia foi analisada mediante a coloração hematoxilina-eosina (HE). Para a coloração imunoistoquímica, os cortes foram desparafinizados com xilol e reidratados com soluções de etanol de concentração decrescente. A recuperação do antígeno foi realizada em citrato de sódio pH 6,0, em banho maria, por 40 min e deixadas por 20min em temperatura ambiente. As lâminas foram imersas por 2 x 15 min em tampão de peróxido (95 ml de metanol e 5ml de H₂O₂ 5%), para bloquear a peroxidase endógena, evitando com isso a coloração de fundo (background). Possíveis sítios de ligações inespecíficas do anticorpo primário (anti-TWIST1) foram

bloqueados, utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) 1% por 1 hora. As secções de tecido foram incubadas overnight com o anticorpo policlonal primário anti-TWIST (H-81; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), em diluição 1/50 e, após a lavagem, incubadas com o segundo anticorpo (anti-anticorpo primário biotilado, Kit Super ABC, EASYPATH), por 40 minutos à temperatura ambiente. A terceira incubação foi com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit Super ABC, EASYPATH), por 40 minutos à temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi visualizada utilizando-se o cromógeno 3,3-diaminobenzidina-tetrahydrocloro (DAB). Após lavagem, as amostras foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 30 segundos, lavadas com água corrente, desidratadas e finalizadas com a adição da lamínula que foi fixada com Entellan.

Na análise da reação imunoistoquímica, cada amostra foi avaliada quanto à extensão (área) e à intensidade da coloração, segundo critérios definidos por Kyo et al (2006). Na análise de extensão da coloração foi observada a área total da lâmina que apresentava imunocoloração positiva, sendo classificada como segue: 0 (0%), 1 (1-30%), 2 (31-60%), 3 (61-100%). Quanto à intensidade, a imunocoloração foi classificada como: 0 (negativa), 1 (fraca), 2 (média), 3 (forte). Para o resultado final da imunocoloração, foi calculado um score de 0 à 6, obtido pela soma da classificação obtidas quanto à extensão e intensidade da imunocoloração observados em cada amostras. As amostras com um score final igual ou superior a 5 foram consideradas amostras que apresentavam hiperexpressão de TWIST.

1.3 Resultados

Em nosso estudo a reação imunoistoquímica positiva de TWIST1 foi predominante citoplasmática, pelo aparecimento de grânulos marrom-acastanhados presente entre os núcleos contracorados com hematoxilina, conforme ilustra a

Figura A1. Em 100% das amostras analisadas a extensão da imunocoloração atingiu 61% à 100% (score 3 de extensão), já a intensidade variou entre fraca a forte (escores 1, 2 ou 3). Entre os 20 pacientes analisados, 19 (95%) apresentavam hiperexpressão de TWIST1 (escore 5 ou 6) na mucosa normal adjacente ao tumor e 15 (75%) no tumor. Estas freqüências não diferem estatisticamente quando analisados a mucosa normal e tumoral de um mesmo paciente ($P=0,37$, McNemar Test).

Paralelamente à imunoistoquímica, as mesmas amostras foram submetidas à análise de metilação utilizando-se o protocolo anteriormente descrito neste trabalho (Fackler, 2003). Os resultados da imunoistoquímica e da análise de hipermetilação do gene TWIST1 (na mucosa normal adjacente ao tumor e no tecido tumoral) foram comparados e estão descritos na Tabela A1.

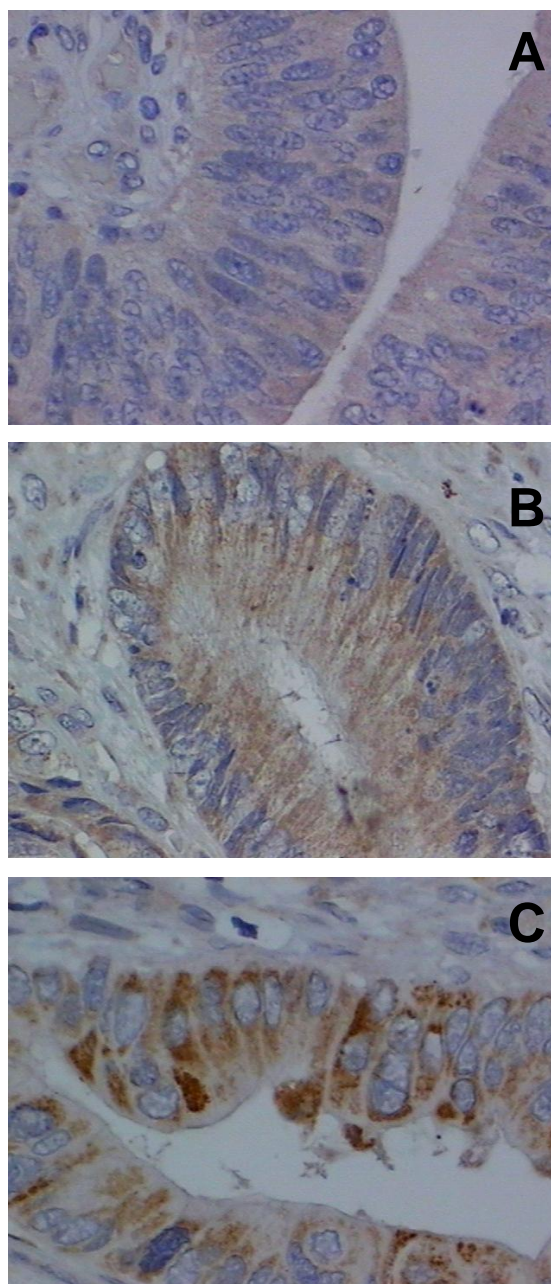


Figura A1. Resultado da imunoistoquímica para análise da expressão da proteína TWIST1 em em diferentes amostras de tumor colorretal (A-C). A intensidade de coloração foi classificada como fraca (A), média (B) ou forte (C).

Tabela A1. Resultados da análise paralela da hipermetilação de TWIST1 e a expressão protéica no tecido tumoral e na mucosa aparentemente normal obtida de 20 pacientes com CRC.

Paciente	Mucosa aparentemente normal			Tumor colorretal (CRC)		
	Metilação	Imunoistoquímica		Metilação	Imunoistoquímica	
		Escore ^a	Expressão		Escore	Expressão
1	Não	5	alta	Não	6	alta
2	Sim	6	alta	Sim	6	alta
3	Não	6	alta	Não	5	alta
4	Sim	4	baixa	Sim	6	alta
5	Não	6	alta	Sim	4	baixa
6	Não	6	alta	Não	5	alta
7	Não	6	alta	Não	5	alta
8	Não	6	alta	Não	NA	NA
9	Não	5	alta	Sim	4	baixa
10	Sim	6	alta	Não	6	alta
11	Sim	6	alta	Sim	5	alta
12	Não	6	alta	Não	4	low
13	Não	6	alta	Não	6	alta
14	Não	6	alta	Não	4	baixa
15	Não	6	alta	Não	6	alta
16	Não	6	alta	Sim	6	alta
17	Sim	5	alta	Sim	5	alta
18	Não	6	alta	Sim	6	alta
19	Não	6	alta	Não	6	alta
20	Não	5	alta	Não	6	alta

NA, amostra não pode ser analisada.

^a Amostras com escore final de 5 ou superior foram consideradas como alta expressão. Para maiores detalhes, veja o texto.

Conclusões parciais

A hiperexpressão de TWIST ocorre no tecido tumoral e a mucosa adjacente de pacientes com CCR, como já havia sido descrito para outros tipos de tumor, porém nunca para CCR. Resultado semelhante obtiveram Gort et al.(2008) ao avaliarem a expressão da TWIST em biopsias de carcinoma da mama e da mucosa tumoral e aparentemente normal de um mesmo paciente, pois concluíram que não houve diferença significativa entre estes tecidos, porém observaram uma leve predominância de hiperexpressão de TWIST no carcinoma de mama em relação à mucosa adjacente ao tumor.

Concluimos que a TWIST é freqüentemente hiperexpressa no CCR, achado pode indicar o envolvimento de Twist na carcinogenese e na evolução clínica deste tipo de tumor. Cabem novos estudos que apontem a relação da hiperexpressão de TWIST com parâmetros clinicopatológicos e de prognóstico de pacientes com CCR, para que a devida compreensão sobre a influência biológica e a possível validação da hiperexpressão de TWIST como um marcador diagnóstico e/ou prognóstico no CCR.

2. Análises de sobrevida global e de sobrevida livre de recidiva para pacientes subclassificados pelo estadiamento.

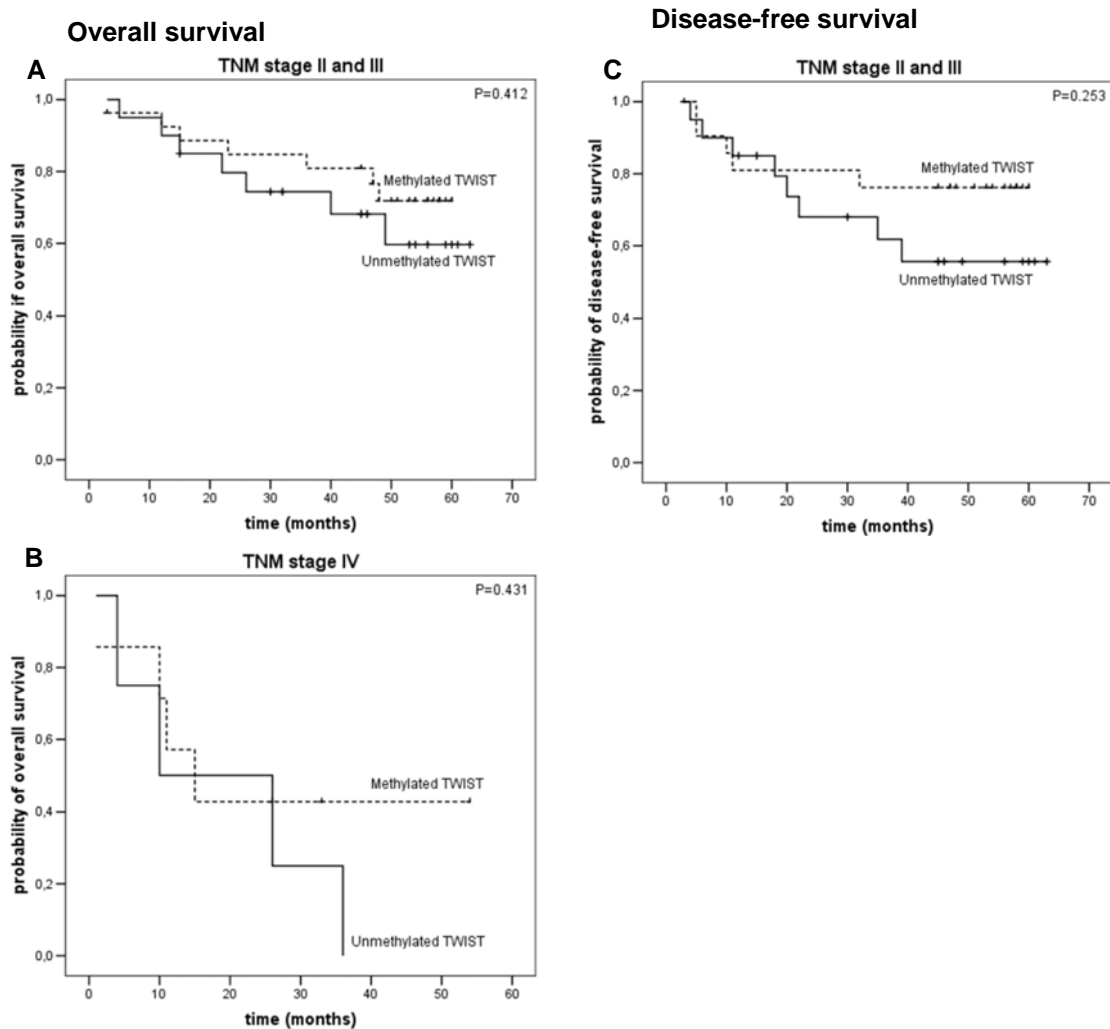


Figure A2. Overall survival and disease-free survival with respect to TWIST hypermethylation in cancer tissue from CRC patients classified according to TNM stage. Survival curves shows that Twist hypermethylation is not significantly correlated with shortened OS neither from patients in TNM stage II and III (A) or TNM stage IV (B). Also, the DFS from patients in TNM stage II and III (C) was not influenced by Twist hypermethylation.

ANEXO 2
Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética da UCSPA

ANEXO 3
Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética do HCPA

ANEXO 4

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa: *Avaliação do papel da hipermetilação da região promotora dos genes CDX1, TWSIT E GSTP-1 na carcinogênese do carcinoma colorretal.*

Este texto foi feito para explicar a você um estudo científico que está sendo desenvolvido pela equipe médica de Proctologia do Hospital de Clínicas, que tem por objetivo conhecer melhor a doença para qual você está sendo tratado.

A causa dos tumores do intestino grosso ainda não está bem esclarecida. Acreditamos a causa dos tumores do intestino grosso possa estar relacionada com algumas **alterações no DNA** ainda pouco estudadas para tipo de tumor. Neste estudo usaremos uma pequena amostra (pedaço de tecido) do tumor retirado de seu intestino, logo após a cirurgia, para analisarmos se esta alteração está ou não presente no tumor. Os resultados obtidos podem trazer informações importantes quanto a sua doença. Se você tiver a alteração, não significa que os seus familiares também a terão, porque ela não foi herdada dos seus pais e talvez nem passe para os seus filhos. Por precisarmos saber mais sobre ela, é que estamos realizando este estudo.

A participação neste estudo é voluntária e implica na autorização da utilização de uma pequena amostra do tumor para a pesquisa. Também implica na autorização para revisão de dados referentes à sua doença a partir de revisão de seu prontuário médico. Não há qualquer risco para você e para a sua família, a participação no estudo não alterará de forma alguma seu tratamento. Você terá acesso a todos os resultados dos seus testes e não haverá qualquer custo financeiro adicional.

A recusa em participar do estudo em nada afetará sua assistência médica. Em caso de divulgação científica dos resultados deste estudo, não haverá qualquer identificação individual, sendo garantido sigilo e anonimato nos dados.

Em caso de dúvida sobre qualquer aspecto do trabalho, você poderá contatar com o médico responsável (Dr. Daniel Damin) pelo telefone 33168245 para maiores esclarecimentos.

Caso você concorde em participar escreva e assine seu nome no espaço abaixo:

Nome do paciente (letra de forma)

Assinatura do paciente

Data:

ANEXO 5**Participação em Eventos e Apresentações resultantes deste trabalho**

- 1. IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular aplicada à Medicina**
NICOLINI, C. ; RUPPENTHAL, R. D. ; DAMIN, A. ; DAMIN, D. ; FERREIRA FILHO, A. F. ; ROSITO, M. A. ; ALEXANDRE, C. O. P.
A hipermetilação dos genes Twist e Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) no carcinoma colorretal.
- 2. ★ 44th ASCO Annual Meeting, 2008, Chicago - Illinois. Journal of Clinical Oncology**
RUPPENTHAL, R. D. ; NICOLINI, C. ; DAMIN, D. ; DAMIN, A. ; FERREIRA FILHO, A. F. ; ROSITO, M. A. ; ALEXANDRE, C. O. P. .
Hypermethylation of the TWIST gene (TG) promoter region is increased in advanced stages and poorly differentiated colorectal carcinoma (CRC)
- 3. ★ 33rd ESMO Congress, 2008, Stockholm Sweden. 33rd ESMO Congress**
RUPPENTHAL, R. D. ; NICOLINI, C. ; DAMIN, A. ; FERREIRA FILHO, A. F. ; ALEXANDRE, C. O. P. . HYPERMETHYLATION OF THE PROMOTER REGIONS OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PI (GSTP-1) AND TWIST GENES IN COLORECTAL CARCINOMA (CRC).. In:, Annals of Oncology,, 2008.
- 4. 1ª Jornada Integrada dos Cursos da Saúde**
NICOLINI, C ; RUPPENTHAL, R. D. ; DAMIN, A ; DAMIN, D ; FERREIRA FILHO, A. F. ; ROSITO, M. A. ; ALEXANDRE, C. O. P. .
A hipermetilação dos genes Twist e Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) no carcinoma colorretal.
- 5. ★ : XXII Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental Fesbe, 2007**
NICOLINI, C. ; RUPPENTHAL, R. D. ; DAMIN, A. ; DAMIN, D. ; ALEXANDRE, C. O. P.
Avaliação da importância clínica da hipermetilação do gene Twist na evolução do carcinoma colorretal primário.
- 6. I Encontro Nacional de Pós-Graduação em Patologia**
RUPPENTHAL, R. D. ; NICOLINI, C. ; DAMIN, D. ; ALEXANDRE, C. O. P. .
A hipermetilação diferencial do gene Twist em tecidos tumorais malignos e na mucosa normal de pacientes com carcinoma colorretal.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)