

Camila Maria da Silva Martinelli

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES ALVO CANDIDATOS EM TUMORES DE
CÉLULAS GERMINATIVAS DE TESTÍCULO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII-Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-Orientador: Dr. Daniel Onofre Vidal

Barretos, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Rafael de Paula Araújo CRB 8/9130
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

M385a Martinelli, Camila Maria da Silva

Avaliação do perfil de metilação de genes alvo candidatos em tumores de células germinativas de testículo / Camila Maria da Silva Martinelli. - Barretos, SP 2015.

109 f. : il.

Orientador: Luiz Fernando Lopes

Co-orientador: Daniel Onofre Vidal

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2015.

1. Neoplasias testiculares. 2. Células germinativas. 3. Metilação. 4. Repressão epigenética. 5. cisplatina. 6. seminoma. I. Autor. II. Lopes, Luis Fernando

CDD 616.994 6

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos.”

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.”

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Maria Lucia Lima da Silva**, que nunca mediu esforços em apoiar meus anseios e também por sempre acreditar que eu sou capaz.

Dedico também, à minha saudosa avó, **Laudelina**, que mesmo não estando ao meu lado, me transmitiu paciência e serenidade para enfrentar os obstáculos ao longo desse trajeto. Penso em você em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor **Dr. Luiz Fernando Lopes** pela incrível ajuda e disponibilidade em me socorrer no início deste trajeto, aceitando me orientar e me recebendo com carinho. Meu sincero agradecimento e respeito pelo seu caráter e profissionalismo.

Ao meu co-orientador, professor **Dr. Daniel Onofre Vidal**, pelo incrível apoio científico que sempre me ofereceu, estando comigo em todos os momentos desse mestrado. Muito obrigada pela confiança, por todas as oportunidades oferecidas, pela calma transmitida e por me fazer acreditar que eu conseguiria chegar até aqui. Devo a minha maturidade científica à você, que foi fundamental para que eu continuasse.

Ao **Dr. Flavio Cárcano**, por todas as sugestões brilhantes e apoio científico que me ofereceu. Agradeço pelo ótimo trabalho em equipe que fizemos.

À **Dra. Mariana Brait** pela contribuição ao desenvolvimento do trabalho e por sempre estar disposta a resolver as dúvidas sobre ele.

Aos membros da Banca de acompanhamento **Dra. Mara Albonei** e **Dra. Céline Pinheiro**, pelas considerações e pontos positivos adicionados a este trabalho.

Ao Núcleo de Apoio ao Pesquisador, o bioestatístico **Cleyton Zanardo** que sempre me auxiliou e foi o responsável pela análise de todos os dados, obrigada. À **Thais**, que me auxiliou com o banco de dados e também sempre esteve disposta.

Ao **Dr. Eduardo Caetano**, por analisar todas as lâminas do estudo e garantir a veracidade de todas as amostras tumorais.

Aos amigos e colegas do CPOM, que nesses dois anos me viram e conheceram mais de mim. Obrigada especial para a **Aline Rocha** que me faz bem todas as manhãs com seu bom humor e alegria de viver. Aos amigos Adriane Feijó, Weder, Paulinha, Maicon, Fernanda Costa, Ana Galuban, obrigada pela companhia e momentos de alegria compartilhados.

Ao **André van Helvoort Lengert**, amigo e namorado, obrigada pelas doses diárias de otimismo, companheirismo, amizade e ciência, e principalmente por me mostrar que tudo tem um lado positivo, não importa o quanto eu não acredite nisso. Obrigada pelo apoio

incondicional no decorrer e principalmente no final deste trabalho, você foi essencial para que eu chegasse até aqui.

À **Lourdes**, minha segunda mãe em Barretos, pelo carinho imenso que tem comigo e pelas orações sempre que pedi. À **Carol**, sua filha, companheira da graduação, obrigada pelo exemplo e apoio no caminho.

À minha irmã, **Ana Carolina**, um exemplo de profissional que eu sigo, obrigada.

Aos meus amigos mais próximos **João Pedro, Elaine, Leticia, Luciana**, que mesmo não entendendo nada sobre minha área de trabalho, me deram apoio para seguir em frente.

Aos meus vizinhos e amigos de condomínio **Francine, Genilton, Débora, Mariana** que definitivamente transformaram minha mudança para cá mais fácil e afetiva.

Je voudrais remercier à **Patricia**, ma professeur de français, qu' en plus de m'enseigner une langue m'enseigne dans chaque classe que avoir de l'amour et le dévouement pour le travail devient la routine du travail parfois très fatiguée dans um grand plaisir.

E sempre agradeço à Deus, e minha enorme fé.

“Todos os que desejam obter pérolas do mar tem que mergulhar profundamente para obtê-las. De nada serve agitar com as mãos as águas perto da praia e dizer que no mar não há pérolas, ou dizer então que todas as formas de pérolas são falsas.”

Maria Leticia Martins

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumores de células germinativas	1
1.1.1	Marcadores séricos	3
1.1.2	Classificação TNMS e estadiamento dos TCGTs	4
1.1.3	Classificação de risco dos TCGTs segundo o IGCCCG	4
1.2	Alterações citogenéticas e moleculares nos TCGs	5
1.3	Alterações epigenéticas: metilação do DNA	6
1.4	Metilação do DNA e câncer	7
1.5	Metilação do DNA e TCGs	8
1.6	Genes candidatos selecionados	10
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVO GERAL	16
3.1	Objetivos específicos	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Amostras tumorais	17
4.1.1	Critério de inclusão	17
4.1.2	Critério de exclusão	17
4.2	Genes alvo selecionados	18
4.3	Extração do DNA do material parafinado	18
4.3.1	Extração do DNA de sangue periférico	18
4.4	Quantificação do DNA	18
4.5	Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio	19
4.6	Metilação do DNA de leucócitos <i>in vitro</i>	19
4.7	Desenho de iniciadores e sondas específicas	21
4.8	Análise de PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP)	22
4.9	Purificação do produto de PCR para sequenciamento	25
4.10	Sequenciamento de DNA	25

4.11	Análise estatística	26
5	RESULTADOS	28
5.1	Avaliação da eficiência da conversão do DNA genômico pelo tratamento com bissulfito de sódio	28
5.2	Características clínico-patológicas das amostras de TCGTs	28
5.3	Análise dos níveis de metilação dos genes alvo por meio da QMSP	30
5.4	Análise da curva ROC e associação do perfil de metilação dos genes com os fatores clínico-patológicos dos pacientes	31
5.4.1	Gene <i>VGF</i>	36
5.4.2	Gene <i>MGMT</i>	37
5.4.3	Gene <i>ADAMTS1</i>	39
5.4.4	Gene <i>CALCA</i>	40
5.4.5	Gene <i>HOXA9</i>	42
5.4.6	Gene <i>CDKN2B</i>	44
5.4.7	Gene <i>CDO1</i>	45
5.4.8	Gene <i>NANOG</i>	47
5.5	Análise de sobrevida global em relação as características clínicas, patológicas e perfil de metilação dos genes	48
5.6	Análise de sobrevida livre de eventos em relação as características clínicas, patológicas e perfil de metilação dos genes	49
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	68
		70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
	ANEXOS	
	Anexo A - Classificação TNMS e estadiamento dos TCGTs	80
	Anexo B - Carta de aprovação do CEP	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da histogênese de TCGs	1
Figura 2 -	Representação da perda do grupo amina da base citosina	20
Figura 3 -	Representação do protocolo de conversão por bissulfito de sódio	21
Figura 4 -	Perfil de amplificação da curva padrão para o gene da <i>ACTB</i> na QMSP	24
Figura 5 -	Sequenciamento do gene <i>ACTB</i> após a conversão por bissulfito de sódio	28
Figura 6 -	Reação de QMSP para o gene <i>CALCA</i>	30
Figura 7-	Gráficos de sobrevida global (SG) em relação as características clínicas e patológicas dos pacientes	52
Figura 8 -	Gráficos de sobrevida livre de eventos (SLE) em relação as características clínicas, patológicas e perfil de metilação dos genes avaliados nos pacientes	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos marcadores séricos (S) antes da orquiectomia.	4
Tabela 2 -	Iniciadores e sondas para avaliação do perfil de metilação da região promotora dos genes alvo avaliados por QMSP.	22
Tabela 3 -	Características clínicas das amostras tumorais (seminomas e não seminomas).	29
Tabela 4 -	Número de amostras tumorais amplificadas para QMSP.	30
Tabela 5 -	Análise numérica da metilação dos genes entre casos e controles.	31
Tabela 6 -	Análise da curva ROC para os genes avaliados.	32
Tabela 7 -	Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC para cada gene.	32
Tabela 8 -	Frequência da metilação do promotor em TCGTs e nas amostras controle.	33
Tabela 9 -	Análise numérica da metilação dos genes para desfecho clínico.	34
Tabela 10 -	Análise da curva ROC para os genes avaliados.	34
Tabela 11 -	Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC para cada gene.	35
Tabela 12 -	Número de casos metilados após estabelecer o ponto de corte pela curva ROC.	35
Tabela 13 -	Associação do estado de metilação do gene <i>VGF</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	37
Tabela 14 -	Associação do estado de metilação do gene <i>MGMT</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	38

Tabela 15 -	Regressão logística múltipla para o gene <i>MGMT</i> .	38
Tabela 16 -	Associação do estado de metilação do gene <i>ADAMTS1</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	39
Tabela 17 -	Regressão logística múltipla para o gene <i>ADAMTS1</i> .	40
Tabela 18 -	Associação do estado de metilação do gene <i>CALCA</i> com características clínicas e patológicas dos pacientes.	41
Tabela 19 -	Regressão logística múltipla para o gene <i>CALCA</i> .	41
Tabela 20 -	Associação do estado de metilação do gene <i>HOXA9</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	43
Tabela 21 -	Regressão logística múltipla para o gene <i>HOXA9</i> .	43
Tabela 22 -	Associação do estado de metilação do gene <i>CDKN2B</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	44
Tabela 23 -	Associação do estado de metilação do gene <i>CDO1</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	46
Tabela 24 -	Regressão logística múltipla para o gene <i>CDO1</i> .	46
Tabela 25 -	Associação do estado de metilação do gene <i>NANOG</i> com as características clínicas e patológicas dos pacientes.	47
Tabela 26 -	Análise da curva ROC para o número de genes metilados.	48
Tabela 27 -	Associação do número de genes metilados com as características	49

clínicas.

Tabela 28 -	Estimativas de sobrevida global em 1, 3 e 5 anos em relação a variáveis clínicas e moleculares dos pacientes.	51
Tabela 29 -	Regressão de Cox múltipla para a sobrevida global.	52
Tabela 30 -	Estimativas de sobrevida livre de eventos em 1, 3 e 5 anos em relação a variáveis clínicas e moleculares dos pacientes.	55
Tabela 31 -	Regressão de Cox múltipla para a sobrevida livre de eventos.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ICD-O	Classificação Internacional de Doenças Oncológicas
AFP	Alfa-fetoproteína
DNMTs	DNA metiltransferases
i(12p)	Isocromossomo 12p
IGCCCG	<i>International Germ Cell Cancer Collaborative Group</i>
LDH	Desidrogenase láctica
OMS	Organização Mundial da Saúde
S	Marcadores séricos
TCG	Tumor de células germinativas
TCGT	Tumor de células germinativas de testículo
TCGNS	Tumor de células germinativas de testículo não seminomatosos
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAM	S-Adenosilmetionina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
hCG	Gonadotrofina Coriônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
UV	Ultra-violeta

HE	Hematoxilina-Eosina
QMSP	PCR quantitativa metilação específica em tempo real
dNTP	2'-deoxynucleosídeo 5'-trifosfato
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
HCl	Ácido Clorídrico
DMSO	Dimetil sulfóxido
AUC	<i>Area under the curve</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
Cq	<i>Quantification Cycle</i>
IC	Intervalo de confiança
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
LI	Limite inferior
LS	Limite superior
SG	Sobrevida global
SLE	Sobrevida livre de eventos

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
x	Vezez
μL	microlitros
μg	microgramas
°C	graus Celsius
nM	nanomolar
mM	milimolar
μM	micromolar
U	unidades
cm	centímetros
RPM	rotações por minuto
G	gravidade
mL	mililitro
M	molar
ng	nanograma

pb pares de bases

mA miliamperes

V volts

p valor de p

n número

v versão

RESUMO

Martinelli CMS. Avaliação do perfil de metilação de genes alvo candidatos em tumores de células germinativas de testículo. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2015.

JUSTIFICATIVA: Os TCGs de testículo (TCGTs) compreendem cerca de 98% de todas as neoplasias testiculares e são separados em dois grupos principais: seminomas e não seminomas. Há uma forte evidência de que o evento inicial na patogênese dos TCGTs ocorra durante o desenvolvimento embrionário e que apesar da variedade histológica desses tumores, estes possuem a mesma origem clonal. Dessa forma, as diferenças biológicas entre seminomas e não seminomas podem explicar o comportamento clínico e a resistência ao tratamento, e o entendimento da base molecular e genética desses tumores representa um importante avanço na busca de novos marcadores moleculares nesta doença. **OBJETIVO:** Estabelecer o perfil diferencial de metilação dos genes *VGF*, *MGMT*, *ADAMTS1*, *CALCA*, *HOXA9*, *CDKN2B*, *CDO1* e *NANOG* em tumores primários de células germinativas de testículo e em testículos normais e associar com as características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram incluídas 72 amostras de TCGTs e 23 amostras de testículo normal. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA e posterior conversão por bissulfito de sódio. Após a conversão, o padrão de metilação das amostras foi avaliado por meio da técnica de PCR em tempo real metilação específica (QMSP). **RESULTADOS:** No nosso trabalho, associações significativas foram encontradas em relação à metilação dos seguintes genes e características clínico-patológicas: *VGF* e alterações nos níveis de marcadores séricos; *MGMT* e tumores não seminomatosos; *ADAMTS1* e presença de pelo menos um sítio metastático além de risco mais elevado do tratamento segundo IGCCCG; *CALCA* e tumores não seminomatosos e tumores refratários ao tratamento; *HOXA9* e pacientes com idade acima de 29,6 anos e também à tumores não seminomatosos; *CDO1* e presença de mais de um sítio metastático, tumores classificados nas categorias de maior risco segundo IGCCCG, além de tumores refratários ao tratamento. Além disso, a combinação de metilação de mais de dois genes foi associada a tumores não seminomatosos. A metilação dos genes avaliados não apresentou impacto nas estimativas de sobrevida global, entretanto, a metilação dos genes *MGMT* e *CALCA* tiveram impacto

negativo nas estimativas de sobrevida livre de eventos. **CONCLUSÕES:** Nossos achados demonstraram que a metilação dos genes *VGF*, *MGMT*, *ADAMTS1*, *CALCA*, *HOXA9* e *CDO1* apresentaram associações significativas com diversos aspectos relacionados à tumorigênese e características clínicas dos TCGTs. Portanto, concluímos que o perfil de metilação destes genes em TCGTs pode contribuir para a compreensão da biologia destes tumores e demonstra potencial como biomarcadores clínicos, merecendo uma investigação mais abrangente.

PALAVRAS-CHAVE: Tumor de células germinativas de testículo; Metilação do DNA; *VGF*; *MGMT*; *ADAMTS1*; *CALCA*; *HOXA9*; *CDKN2B*; *CDO1*; *NANOG*.

ABSTRACT

Martinelli CMS. Evaluation of the methylation profile of candidate target genes in germ cell tumors of testis. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2015.

BACKGROUND: Testicular germ cell tumors (TGCTs) comprise about 98 % of all testicular neoplasms and are separated into two main groups: seminomas and non-seminomas. Strong evidences suggest that the first event in the pathogenesis of TGTs occurs during the embryonal development and besides the hystological variety of these tumors, they have the same clonal origin. Thus, biological differences between seminomas and non-seminomas may explain the clinical behavior and treatment resistance, and understanding the molecular and genetic basis of these tumors implies an important advance in the search for new TGCTs molecular markers. **AIMS:** To evaluate the promoter methylation status of: *VGF*, *MGMT*, *ADAMTS1*, *CALCA*, *HOXA9*, *CDKN2B*, *CDO1* and *NANOG* in primary TGCTs and in normal testis and associate with clinico-pathological parameters and with overall, and event-free survivals. **MATERIAL AND METHODS:** We studied 72 TGCTs and 23 normal testis. The DNA extraction was performed followed by bisulfite conversion. The methylation profile of the samples was assessed by Real time methylation specific PCR. **RESULTS:** Statistical significance was found regarding the methylation of the following genes and clinico-pathological parameters: *VGF* and changes in levels of serum markers; *MGMT* and non-seminomas tumors; *ADAMTS1* and more than one metastatic site as well as higher risk of treatment according to IGCCCG; *CALCA* and non-seminomas tumors and refractory tumors to treatment, *HOXA9* and patients older than 29.6 years and also non-seminomas tumors; *CDO1* and the presence of more than one metastatic site, tumors classified in the highest risk according to IGCCCG, and refractory tumors to treatment. Furthermore, the combination of methylation of two genes was further associated with non-seminomatous tumors. The methylation of the genes showed no impact on overall survival, however, the methylation of the *MGMT* gene and *CALCA* gene had a negative impact on event free survival. **CONCLUSIONS:** Our findings showed that methylation of the genes *VGF*, *MGMT*, *ADAMTS1*, *CALCA*, *HOXA9* and *CDO1* were significantly associated with several aspects related to tumorigenesis and clinical characteristics of TGCTs. We therefore conclude that

the methylation profile of these genes in TGCTs can contribute to the understanding of the tumoral biology and demonstrates potential as clinical biomarkers, deserving a more comprehensive investigation.

KEY WORDS: Testicular germ cell tumors; DNA methylation; *VGF*; *MGMT*; *ADAMTS1*; *CALCA*; *HOXA9*; *CDKN2B*; *CDO1*; *NANOG*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores de células germinativas

Os tumores de células germinativas (TCGs) fazem parte de um grupo heterogêneo e complexo de neoplasias derivado das células germinativas primordiais pluripotentes, que compreendem diferentes comportamentos clínicos, podendo ser benigno ou maligno¹. Variações na diferenciação da célula progenitora dos TCGs definem a histologia e a localização do tumor: gonadal ou extragonadal². Segundo a literatura, durante o desenvolvimento do TCG, as células passam por um estágio de carcinoma *in situ* antes de se diferenciarem em seminomas ou em células indiferenciadas de carcinoma embrionário. Assim, por meio da diferenciação, essas células resultam em tecidos embrionários ou extraembrionários que, por sua vez, podem se diferenciar em coriocarcinoma, tumor de seio endodérmico ou teratoma, constituindo desta maneira o grupo dos não seminomas (Figura 1)³.

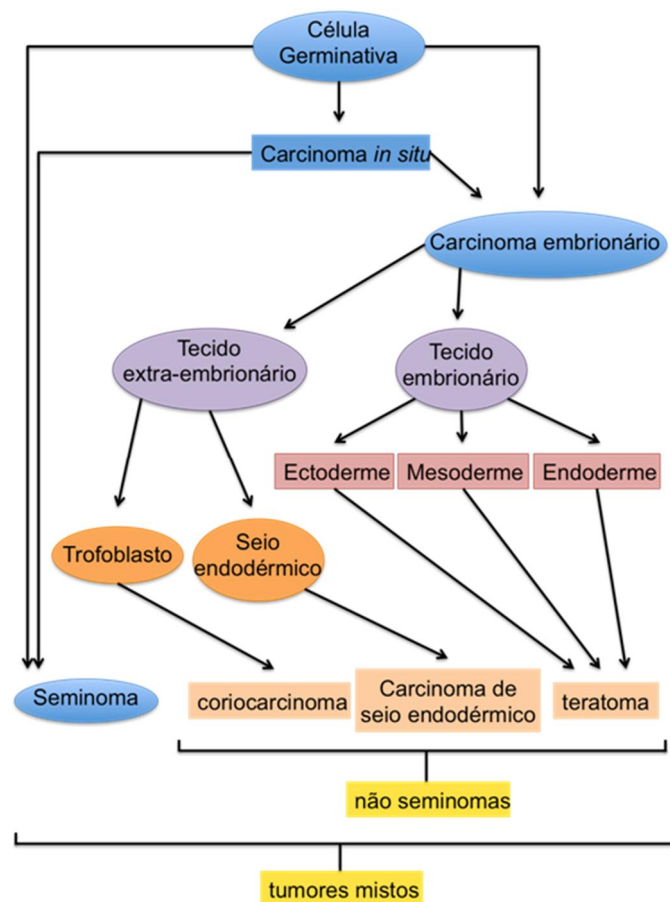


Figura 1. Representação esquemática da histogênese de TCGs (retirado de Masters et al.³).

Nos últimos anos, diferentes classificações histológicas foram propostas para a estratificação desses tumores. Atualmente, a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), classifica os TCGs em: (I) Germinoma – chamado de seminoma quando localizado no testículo, e disgerminoma quando no ovário; (II) Tumor de seio endodérmico; (III) Carcinoma embrionário; (IV) Coriocarcinoma; (V) Tumor misto e (VI) Teratoma⁴.

Os TCGs de testículo (TCGTs) compreendem cerca de 98% de todas as neoplasias testiculares e são separados em dois grupos de acordo com a Classificação Internacional de Doenças Oncológicas (ICD-O): seminomas e não seminomas, cada um compreendendo aproximadamente 50% dos casos⁵. Em relação aos TCGTs, são diagnosticados cerca de três a seis novos casos a cada 100.000 homens por ano nos países desenvolvidos, representando a malignidade mais comum entre homens com as idades entre 20 e 35 anos, sendo a segunda causa de morte atribuída a câncer neste grupo⁶.

As diferenças biológicas entre seminomas e não seminomas podem explicar o comportamento clínico e a resistência ao tratamento de alguns pacientes que precisam de quimioterapia, e o entendimento da base molecular e genética desses tumores representa um importante avanço para o tratamento de pacientes com prognóstico desfavorável na busca de novos marcadores moleculares.

O tratamento padrão do tumor do TCG de testículo é composto de orquiectomia radical unilateral por via inguinal, seguido ou não de tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia. O uso de tratamentos após a cirurgia vai depender do risco do paciente e do estadiamento da doença. Mais de 90% dos casos recém diagnosticados e 70% a 80% dos pacientes com doença avançada submetidos à quimioterapia, atingem a cura. Entretanto, para os pacientes refratários ao tratamento, poucas estratégias alternativas de tratamento estão disponíveis e, quase a totalidade destes pacientes evolui a óbito⁷. Um estudo realizado por Lopes et al.⁸, relatou a importância de estabelecer um protocolo de tratamento padrão para a melhora na sobrevida dos pacientes. Foram avaliadas a sobrevida de 106 crianças e adolescentes com TCG (entre estes 22 de localização testicular) tratadas no Brasil com o protocolo TCG-91, e o estudo identificou uma estimativa de sobrevida global de 83,3% em cinco anos para pacientes de alto risco tratados com cisplatina e etoposide, e uma estimativa de sobrevida global de 58,8% em cinco anos para pacientes também de alto risco, mas que receberam um tratamento combinado com três drogas. Dessa maneira, verificaram

que o uso de um tratamento complexo composto por muitas drogas pode não ser necessário para atingir uma maior estimativa de sobrevida global, mesmo para aqueles pacientes com doença avançada.

Há uma forte evidência de que o evento inicial na patogênese dos tumores de célula germinativa de testículo ocorra durante o desenvolvimento embrionário e que apesar da variedade histológica desses tumores, estes possuem a mesma origem clonal e derivam de um estágio precursor intratubular neoplásico (carcinoma *in situ*), compartilhando anormalidades citogenéticas similares e fenótipos distintos entre seminomas e não seminomas, bem como diferenças nos perfis de expressão gênica e epigenético⁹.

1.1.1 Marcadores biológicos

A secreção de proteínas séricas como a alfa-fetoproteína (AFP) e a porção beta da gonadotrofina coriônica (beta-hCG) são marcadores importantes no manejo desta doença. A AFP, o beta-hCG e também a lactato desidrogenase (LDH) apresentam um papel importante como marcadores biológicos no diagnóstico e estadiamento dos tumores de células germinativas de testículo e seus valores devem ser conhecidos antes da cirurgia para remoção do tumor. Para os pacientes com tumores não-seminomatosos, a queda dos níveis séricos dessas proteínas após a cirurgia é um dos fatores de prognóstico mais importante¹⁰.

Além disso, o monitoramento do avanço da doença é baseado na verificação dos níveis desses marcadores, sendo que o aumento é um dos primeiros sinais de recaída. Existe um aumento no nível dos marcadores em 51% dos casos de câncer de testículo. A elevação da AFP ou beta-hCG é vista em 40 a 60% dos homens com tumores não-seminomatosos. Quanto aos tumores seminomatosos, 30% podem apresentar ou desenvolver um elevado beta-hCG durante o desenvolvimento da doença. Seminomas e não seminomas podem apresentar LDH elevados, porém é um marcador menos específico e sua concentração é proporcional ao volume do tumor. Ainda, a elevação do LDH está associada com outras doenças, além de TCGs¹¹.

Logo, os níveis de marcadores tumorais séricos (S) são divididos em categorias: Sx, uma vez que os exames dos marcadores não foram realizados, S0 quando os marcadores estão dentro dos níveis normais, e S1, S2 e S3 quando estes marcadores encontram-se alterados, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos marcadores séricos (S) antes da orquiectomia.

S	AFP(ng/mL)	hCG (mIU/mL)	LDH(U/l)
S1	<1.000 e	<5.000 e	<1.5 x N
S2	1.000-10.000 ou	5.000-50.000 ou	1.5-10 x N
S3	> 10.000 ou	>50.000 ou	>10 x N

N indica o limite máximo dos níveis de normalidade para o LDH.

1.1.2 Estadiamento dos TCGTs

O estadiamento dos TCGTs no adulto é realizado conforme o manual da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. A classificação “T” se refere a características de invasão local do tumor. A classificação “N” se refere à extensão do comprometimento dos linfonodos regionais e a classificação “M” reflete a presença de metástases a distância, assim como o local onde ela se encontra. Caracteristicamente, o nível dos marcadores tumorais séricos (S) também são levados em consideração para o apropriado estadiamento da doença. O agrupamento das classificações T, N, M e S ditam o estadiamento final correspondente (Anexo A). O estadiamento é realizado e baseado nos resultados da cirurgia e no resultado anátomo-patológico e são considerados: 1) Estadiamento I, o tumor é limitado ao testículo; 2) Estadiamento IS, o tumor é limitado ao testículo e os marcadores séricos estão elevados após a orquiectomia; 3) Estadiamento II, o tumor acomete também o retroperitônio, através de metástases restritas aos linfonodos regionais. É dividido em IIA, IIB e IIC de acordo com o comprometimento nodal e o nível dos marcadores séricos; 4) Estadiamento III, há presença de metástases além dos linfonodos regionais, também sendo dividido em IIIA, IIIB e IIIC, conforme o sítio de metástases e os níveis dos típicos marcadores tumorais (Anexo A)¹².

1.1.3 Classificação de risco dos TCGT segundo IGCCCG

Uma grande contribuição para avaliar o risco de forma mais sensível dos pacientes com TCGTs foi feita com os resultados do *International Germ Cell Cancer Collaborative Group (IGCCCG)* em 1997¹³. O IGCCCG avaliou mais de 5.000 pacientes com TCG não-seminomatosos (TCGNS) e 660 pacientes com seminoma avançado, com tempo de seguimento mediano de 5 anos. Para os casos pertencentes ao grupo dos não seminomas,

alguns fatores adversos independentes do prognóstico foram identificados: o sítio primário no mediastino e a presença de metástases viscerais não pulmonar, além do grau de elevação da AFP, beta-hCG e LDH. Para os seminomas, a característica adversa predominante foi a presença de metástases viscerais não pulmonar. Portanto, o IGCCCG utiliza a classificação TNMS junto com a histologia, a localização do tumor primário, localização das metástases e níveis dos marcadores séricos pré quimioterapia para categorizar os pacientes considerados avançados. A integração destes fatores identificou grupo de pacientes com bom prognóstico, compreendendo 60% dos TCGs com 91% de estimativa de sobrevida global em 5 anos; grupo com prognóstico intermediário, compreendendo 26% dos TCGs com 79% de estimativa de sobrevida em 5 anos, e grupo com pior prognóstico, representando 14% dos TCGs (todos com TCGNS) com 48% (42% a 54%) de estimativa de sobrevida em 5 anos. Estes grupos fazem parte atualmente da tomada de decisão no tratamento de todos os TCGTs e não devem prescindir no adequado manejo desta doença¹³.

1.2 Alterações citogenéticas e moleculares nos TCGs

Até o momento, são poucos os estudos citogenéticos sobre os TCGs. A primeira anormalidade cromossômica relatada nesses tumores foi a duplicação do braço curto do cromossomo 12 ou isocromossomo 12p [i(12p)] por Atkin & Baker¹⁴. Uma análise realizada por citogenética convencional em 124 homens adultos identificou o i(12p) como um marcador comum em todos os subtipos histológicos de tumores de células germinativas de testículo, sendo encontrado em mais de 86% dos casos investigados¹⁵. Alguns grupos utilizaram a técnica de hibridação genômica comparativa (aCGH) para identificar regiões menores relacionadas a perdas e ganhos cromossômicos nestes tumores. Kraggerud et al.¹⁶, ao estudarem 13 tumores de células germinativas de testículo não seminomatosos, encontraram perda de 10q em 38%, ganhos da parte proximal de 17q em 85%, amplificação de 12p em 62% e ganho de 22q em 16%. Além disso, outros trabalhos como o de Schneider et al.¹⁷, ao utilizar a mesma tecnologia, encontraram ganhos de 1q, 3p, 3q e 20q em crianças portadoras de tumores malignos não seminomatosos.

Em relação a alterações moleculares, ao contrário de outros tipos de tumor, as mutações de *TP53* em TCGs são raras mas quando presentes parecem estar relacionadas com tumores mais resistentes a quimioterapia¹⁸. Um trabalho recente de nosso grupo

também demonstrou que mutações na região promotora do gene *TERT* são raras em TCGTs¹⁹.

Além disso, mutações somáticas no gene *KIT*, responsável pela expressão de um receptor transmembrana tirosina quinase do tipo III, são as mais frequentemente observadas em TCGT chegando a aproximadamente 10% de todos os casos (COSMIC database - <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>). Tais mutações ocorrem principalmente em seminomas e algumas evidências sugerem que elas acontecem durante a fase inicial da embriogênese e que devem possuir um papel central no controle e progressão dos seminomas^{20, 21}.

1.3 Alterações epigenéticas: metilação do DNA

O termo epigenética se refere à mudanças na expressão gênica e na organização da cromatina que não estão associadas à mudanças na sequência primária do DNA, podendo ser herdáveis por muitos ciclos de divisão celular²².

Há três tipos de mecanismos associados à manutenção da herança epigenética que é transmitida de maneira estável: a metilação do DNA, a modificação de histonas e a regulação que ocorre por RNAs não codificadores, todos essenciais para o desenvolvimento normal. A desregulação desses mecanismos pode levar a um fenótipo anormal e ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o câncer²³.

A metilação do DNA é uma das modificações epigenéticas mais estudadas no genoma e pode afetar a transcrição gênica, levando ao silenciamento de genes. Em estados fisiológicos normais é extremamente importante para a ocorrência dos processos de *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X. A metilação do DNA consiste em uma modificação química covalente referente à adição de um radical metil predominantemente no carbono da posição 5 do anel da citosina, que é por sua vez seguida por uma base guanina, o qual é conhecido como dinucleotídeo CpG. Nas células somáticas, a metilcitosina representa 1% do total de bases e aparece em 70-80% de todos os dinucleotídeos CpG no genoma²⁴.

O genoma humano possui regiões com uma alta densidade de dinucleotídeos CpG, denominadas ilhas CpG, que estão frequentemente localizadas nas regiões promotoras dos genes e, normalmente encontram-se desmetiladas²⁵. Estimativas demonstram a existência de 29.000 ilhas CpG no genoma humano, e que aproximadamente 60% dos genes humanos

apresentam essas ilhas em suas regiões promotoras, as quais a grande maioria são desmetiladas em todos os estágios de desenvolvimento nos diferentes tipos de tecidos²⁶.

O padrão de metilação de CpGs ao longo da fita do DNA tende a ser copiado, e isso permite transmitir informações epigenéticas entre as gerações de células, sendo um processo essencial para o ciclo celular. As enzimas da família das DNA metiltransferases (DNMTs) são responsáveis pela metilação do DNA e por sua manutenção. Três principais DNMTs estão envolvidas nesse processo: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT1 é a mais abundante em células somáticas, tem preferência por DNA hemimetilado sendo a principal responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA durante a duplicação celular²⁷. As DNMT3A e DNMT3B são expressas em células embrionárias e não diferenciadas, e estão envolvidas com a metilação *de novo* no genoma, contribuindo com o estabelecimento de novos padrões de metilação²⁸.

Sendo assim, as DNMTs são consideradas alvos terapêuticos interessantes visto que a metilação do DNA pode ser revertida pela inibição dessas enzimas. Atualmente duas drogas que possuem esse mecanismo de ação encontram-se disponíveis no mercado: a azacitidina e a decitabina²⁹. Atualmente, a 5-azacitidina é o tratamento padrão para pacientes de alto risco para a síndrome mielodisplásica e tem sido estudada em pacientes idosos portadores de leucemia mieloide aguda³⁰.

1.4 Metilação do DNA e câncer

O câncer é uma desordem heterogênea com diferentes propriedades biológicas causado por uma série de mudanças genéticas, em genes supressores tumorais e oncogenes, que ocorrem em sinergia com alterações epigenéticas, as quais levam a uma instabilidade cromossômica durante a iniciação e progressão tumoral³¹.

Mesmo havendo evidências de que a perda da regulação epigenética possa ser o evento transformante preliminar para a carcinogênese³², não se sabe se os eventos epigenéticos exercem um papel causal no desenvolvimento dos tumores e na sua progressão, ou se são consequências de um fenótipo anormal nas células malignas³³. A metilação aberrante do DNA, principalmente quando ocorre em ilhas CpG localizadas na região promotora de genes, está associada a uma expressão de genes alterada, a qual pode ser silenciada durante a transformação maligna³⁴.

O equilíbrio epigenético de uma célula normal se encontra desestabilizado durante a tumorigênese, e nas neoplasias humanas ocorrem dois eventos principais na metilação do DNA: a hipometilação global e a hipermetilação de regiões promotoras associadas ao silenciamento de genes supressores tumorais³².

A perda global da metilação dos CpGs foi a primeira alteração epigenética identificada em células com potencial maligno. Uma queda de 20-60% de conteúdo de metilcitosina foi observada em células malignas quando comparada ao seu conteúdo normal, e essa perda de grupos metil é acompanhada principalmente de alterações em regiões intrônicas do DNA, bem como de ativação de proto-oncogenes, resultando em uma instabilidade cromossômica que contribui para o desenvolvimento do tumor³⁴.

Exemplos de genes que são afetados pela hipometilação incluem oncogenes como *HRAS* e *C-MYC*³⁵. Além disso, uma análise genômica da metilação em tumores de estômago, rim, cólon, pâncreas, fígado e pulmão revelou uma alta frequência de sítios hipometilados nos respectivos tecidos tumorais³².

Concomitantemente à hipometilação global, a hipermetilação aberrante da região promotora dos genes é um mecanismo que frequentemente contribui com o silenciamento de genes supressores tumorais e foi primeiramente descrita no gene do retinoblastoma (*RB*)³⁶.

A hipermetilação na região promotora de genes tem sido associada com um grande número de neoplasias. Diversos genes supressores tumorais como *BRCA1*, *TP53*, *RASSF1A*, *LKB1*, *p15* e *MLH1* já foram descritos como metilados em uma série de tumores e, a inativação destes genes através da hipermetilação parece ter a mesma consequência da inativação por meio de alterações genéticas, como por exemplo as mutações²³.

1.5 Metilação do DNA e TCGs

As células germinativas são fundamentais na transmissão de informações genéticas e epigenéticas entre as gerações celulares. Durante o desenvolvimento normal, elas passam por processos de proliferação, renovação e diferenciação que levam a formação de gametas, que quando fertilizados são submetidos a processos de regulação moleculares necessários à embriogênese. Dessa maneira, a transformação de células germinativas pode resultar em tumores que exibem regulações moleculares semelhantes as que ocorrem durante a gametogênese e o desenvolvimento normal⁷.

Originando-se de células germinativas primordiais, os TCGTs surgem em um momento do desenvolvimento da linhagem germinativa em que a metilação do DNA é apagada e restabelecida após a implantação do embrião, provavelmente pela ação das metiltransferases DNMT3A e DNMT3B, e mantida pela DNMT1²⁸. Devido a isso, a metilação do DNA em TCGTs deve ser avaliada no contexto das células germinativas primordiais, de onde os tumores se originam³⁷.

Tendo em vista os eventos do início do desenvolvimento das células germinativas, uma das questões mais comuns relacionada à biologia dos TCGTs é como diferentes tumores podem se originar de um mesmo tipo celular. Apoiando-se em evidências de que o grau de diferenciação dessas células esteja relacionado com o perfil de metilação do genoma, acredita-se que uma reprogramação epigenética ocorra durante o desenvolvimento dos tumores de células germinativas³⁸.

Histologicamente, os seminomas são um grupo não diferenciado que morfológicamente se assemelha a células germinativas primordiais enquanto os não seminomas incluem vários subtipos histológicos que possuem diferenciação somática, embrionária e extra-embrionária³⁹.

O primeiro estudo que verificou o padrão de metilação em relação a estes dois grupos mostrou uma hipermetilação abundante em tumores não seminomatosos, mas não em seminomas⁴⁰. Da mesma forma, Smiraglia et al.⁴¹ demonstraram diferenças epigenéticas significativas entre não seminomas e seminomas, os quais os últimos quase não apresentaram metilação nas ilhas CpG. Por meio da análise de metilação por imunohistoquímica, Netto et al.⁴² concluíram que as células de seminomas geralmente conservam a hipometilação que ocorre devido ao apagamento normal das marcas de metilação, enquanto que os não seminomas apresentam maior grau de metilação, que está associado ao maior grau de diferenciação celular.

Um estudo realizado por Brait et al.³⁸ retratou a heterogeneidade do perfil de metilação entre 43 seminomas, 14 não seminomas testiculares e 23 amostras de testículo normal. Analisando a metilação do promotor em um painel de 15 genes na tentativa de estabelecer marcadores específicos que pudessem discriminar os dois subtipos tumorais, seis destes genes foram encontrados diferencialmente metilados, incluindo *MLH1*, *MGMT* e *APC*, com um predomínio de metilação nos tumores não seminomatosos. Além de diferentes padrões de metilação entre tumores e tecidos normais, padrões distintos de metilação entre

seminomas e não seminomas, observado pelo autores, estabelecem importantes evidências na descoberta de como esses grupos se diferenciam no decorrer do seu desenvolvimento.

Amatruda et al.⁴³, analisaram o padrão de metilação em 51 amostras de TCGs, representando os principais subtipos histológicos em TCGs pediátricos: germinoma, teratoma e tumor de seio endodérmico. Utilizando o painel de metilação de câncer *GoldenGate* (Illumina, Inc.) e pirosequenciamento, os autores demonstraram que os tumores de seio endodérmico apresentaram um nível de metilação 2,75 vezes maior que os outros tumores estudados. Também identificaram 190 ilhas CpG com diferenças significativas de metilação entre teratomas maduros e imaturos. Além disso, o padrão de metilação foi comparado entre tecidos tumorais e normais adjacentes, e para os tumores de seio endodérmico foram encontrados 425 CpGs diferencialmente metilados, enquanto a mesma comparação foi feita para teratomas, encontrando somente 15 CpGs diferencialmente metilados, evidenciando novamente, um padrão de metilação distinto para tumores de seio endodérmico.

Assim, a determinação de perfis diferenciais de metilação representa uma importante etapa na identificação de novos marcadores epigeneticamente silenciados no câncer e a diferença nos padrões de metilação de ambos os grupos (seminomas e não seminomas) pode refletir o desenvolvimento normal das células germinativas primordiais, auxiliando no entendimento da origem desses tumores.

1.6 Genes candidatos selecionados para avaliação da metilação

A progressão de tumores ocorre devido a atividade de vários genes que regulam positivamente ou negativamente as funções celulares, incluindo o controle da proliferação, apoptose, estabilidade genômica, angiogênese, invasão e metástase, entre outros. Muitos fatores podem alterar a função desses genes, incluindo alterações genéticas e epigenéticas⁴⁴.

A metilação da região promotora está frequentemente associada com o silenciamento dos genes. Assim, a descoberta de genes regulatórios bem como seu perfil de metilação é relevante para o entendimento da biologia do câncer e identificação de novos alvos terapêuticos⁴⁵.

Na tentativa de identificar genes supressores tumorais silenciados pela metilação do promotor em TCGTs, oito genes candidatos foram escolhidos para a avaliação neste projeto.

Quatro deles (*MGMT*, *VGF*, *HOXA9* e *NANOG*) já foram avaliados em tumores de células germinativas e os quatro restantes (*CDKN2B*, *CDO1*, *CALCA* e *ADAMTS1*) são frequentemente descritos como hipermetilados em outros tipos tumorais. A escolha destes genes foi baseada na literatura e na função de cada um deles, que serão apresentadas a seguir.

Um estudo recente realizado por Brait et al.³⁸, relatou a hipermetilação em *MGMT* e *VGF* em não seminomas quando comparados a seminomas. Entretanto, acredita-se que os autores não conseguiram associar estes padrões de metilação a características clínico-patológicas devido a amostragem restrita.

O gene *MGMT* é um gene de reparo do DNA, que tem como função remover adutos mutagênicos e citotóxicos de O⁶-metilguanina da molécula de DNA. Uma vez que alterações no gene *MGMT* impedem sua ação, o risco de ocorrência de mutações e de câncer é aumentado⁴⁵. A perda da expressão de *MGMT* não é comum devido a uma deleção ou rearranjo do gene, então, sugere-se que outras causas como mudanças epigenéticas estejam envolvidas no seu silenciamento, como a hipermetilação de ilhas CpG em sua região promotora⁴⁶. A metilação do *MGMT* já foi descrita em uma série de tumores sendo importante para uma decisão terapêutica principalmente em tumores do sistema nervoso central. Os glioblastoma que apresentam a hipermetilação de *MGMT* são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos da quimioterapia com agentes alquilantes, enquanto *MGMT* não metilado tem um impacto desfavorável predominante na subpopulação de pacientes não-ressecáveis. Dessa maneira, a não metilação do *MGMT* pode ser considerado o principal preditor de mau prognóstico, devido a maior probabilidade de o paciente não ter benefícios de terapias adjuvantes⁴⁷.

O gene *VGF* é especificamente expresso em células neuroendócrinas e apesar da sua exata função ainda não ser conhecida, parece estar relacionado com a sobrevivência motora neural⁴⁸. Uma alta frequência de metilação de *VGF* em carcinomas ovarianos foi encontrada por Brait et al.⁴⁹, e a metilação câncer específica de *VGF* em câncer de mama e câncer de testículo foram descritas recentemente por Brait et al.³⁸, e Ostrow et al.⁵⁰. Uma forte ligação entre a hipermetilação da ilha CpG de *VGF* em linhagens celulares e a perda da expressão gênica nessas células foi encontrada, entretanto papéis biológicos de *VGF* na tumorigênese precisam ser elucidados⁵¹.

O gene *HOXA9* é um fator de transcrição, e faz parte da família dos genes *homeobox*. A expressão dessas proteínas é temporariamente regulada durante o desenvolvimento

embrionário e a inativação da expressão desse gene pela hipermetilação pode ter particular importância na tumorigênese das células germinativas, que é caracterizada pela diferenciação embrionária⁵². O trabalho realizado por Amatruda et al.⁴³, demonstrou que o *HOXA9* apresentou diferença significativa nos padrões de metilação em TCGs, dependendo da histologia tumoral, sendo hipermetilado principalmente em tumores de seio endodérmico. Lind et al.⁵³, encontraram uma alta frequência de metilação de *HOXA9* em TCGTs, sugerindo que a inativação epigenética de alguns genes dessa família desempenha um papel importante no desenvolvimento desses tumores.

Um fator de transcrição envolvido na manutenção da pluripotência e renovação das células tronco embrionárias é o *NANOG*, que é utilizado como um marcador para TCGs⁹. Está localizado no cromossomo 12, em uma região frequentemente duplicada em tumores de origem de células germinativas, portanto a falha no restabelecimento da expressão de *NANOG* é considerada um fator crítico para a tumorigênese de células germinativas. Hart et al.⁵⁴, sugerem que a regulação da expressão desse gene se deve a um mecanismo epigenético. No estudo feito por Tommasi et al.⁵⁵, os autores demonstraram que um valor preditivo da metilação deste gene em casos de câncer pode ser utilizada como um marcador epigenético para uma detecção precoce e monitoramento da progressão da malignidade da doença.

O gene *CDKN2B* codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, que inibe a ativação de CDK4 e CDK6, controlando as funções como crescimento celular e progressão do ciclo celular. Está localizado no cromossomo 9 em uma região frequentemente mutada e deletada em muitos tumores⁵⁶. É sugerido que a metilação de *CDKN2B* seja um biomarcador epigenético de evolução da síndrome mielodisplásica pediátrica, confirmando a relação da hipermetilação desse gene aplicada ao uso na estratificação de risco de pacientes portadores da doença⁵⁷. Outro estudo que verificou a hipermetilação desse gene em pacientes com SMD, notou semelhanças com a patogênese em adultos e sugerem o possível benefício em pacientes pediátricos com o tratamento feito por agentes desmetilantes⁵⁸.

O gene cisteínadesoxigenase (*CDO1*) está localizado na região 5q23.2, uma região cujo silenciamento epigenético contribui para a tumorigênese do câncer colorretal⁵⁹. Brait et al.⁶⁰ identificaram que a detecção e quantificação da metilação do promotor de *CDO1* pode ser utilizada como um biomarcador diagnóstico para muitos tipos de câncer, devido a sua alta

frequência em tumores primários e ausência em tecidos normais. Porém, este estudo não incluiu TCGTs.

O gene *CALCA* codifica uma proteína com função vasodilatadora, e foi demonstrado como frequentemente metilado em câncer cervical quando comparado a tecido cervical normal⁶¹. Esteller et al.⁶² demonstraram a ilha CpG no gene *CALCA* como frequentemente metilada em linfomas e câncer de pulmão.

O gene *ADAMTS1* é um membro da família das metaloproteinases e participa de vários eventos biológicos como inflamação e angiogênese. O papel dessa molécula na progressão tumoral foi sugerido por Rocks et al.⁶³, agindo na atração de fibroblastos e remodelação da matriz extracelular. Um estudo realizado por Freitas et al.⁶⁴, encontrou baixa expressão de *ADAMTS1* em tumores de mama quando comparados a tecidos normais. A análise epigenética de algumas regiões gênicas em tumores de próstata e normais, mostrou a hipermetilação em *ADAMTS1* em tecidos tumorais⁶⁵. Em uma análise *in silico* realizada pelo nosso grupo utilizando-se o banco de dados *Oncomine* (www.oncomine.org) foi possível observar a diferença de expressão de *ADAMTS1* entre diferentes histologias de TCGs. Este gene já está sendo avaliado quanto a sua expressão proteica em TCGTs em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo. Porém, a análise de metilação desse gene ainda não foi realizada em TCGTs.

2 JUSTIFICATIVA

Ainda que, os tumores de células germinativas de testículo apresentem altas taxas de cura e sobrevivência devido à boa resposta à terapia, consequências significativas de terapias multimodais existem em termos de saúde geral, neoplasias secundárias tardias, a reprodução e a produtividade econômica dos indivíduos. Portanto, ainda existe a necessidade de melhor compreensão da biologia dos TCGTs para auxiliar a indicação de terapias menos deletérias aos pacientes. Além disso, esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dos TCGTs também é de extrema importância nos casos de pacientes refratários aos tratamentos de primeira linha, pois pode auxiliar na indicação do uso de terapias alternativas mais eficazes nestes casos.

Apesar de alterações moleculares estarem descritas em TCGTs, a biologia dos TCGs é pouco explorada. Assim, ainda há necessidade de se identificar genes importantes para o desenvolvimento e estabelecimento da doença. Uma das questões mais intrigantes da biologia do TCGTs é a forma como esses subtipos de tumor de histologia distinta (seminomas e não seminomas) podem surgir a partir do mesmo tipo de célula (célula germinativa). A hipótese de que essa célula germinativa siga diferentes programas de diferenciação celular, resultando nos diversos subtipos histológicos de TCGs, torna a busca pelo perfil de metilação de genes um campo muito importante de investigação, uma vez que esse mecanismo epigenético é um dos principais controladores do processo de diferenciação celular.

Este trabalho é parte dos estudos desenvolvidos pelo Grupo de Estudos de TCG do Hospital de Câncer de Barretos, que é um centro de referência de tratamento de TCGs pediátricos e adultos. Este grupo multiprofissional vem desenvolvendo pesquisas genéticas, epigenéticas, moleculares e clínicas para um maior conhecimento dos TCGs e possui várias frentes de pesquisa em andamento.

Nossa proposta é avaliar o perfil de metilação da região promotora de oito genes candidatos (*MGMT*, *VGF*, *HOXA9*, *NANOG*, *CALCA*, *CDKN2B*, *CDO1* e *ADAMTS1*) em amostras de tumores primários de células germinativas de testículo (seminomas e não seminomas) e em amostras de testículos normais e correlacionar este perfil com as características clínico-patológicas dos pacientes, visando o melhor entendimento do papel do silenciamento epigenético na tumorigênese dos TCGTs. Isso não apenas contribuirá com uma análise do perfil diferencial de metilação de um painel de genes em tumores de células germinativas de

testículo, mas também poderá revelar novos marcadores moleculares de prognóstico ou resposta a terapia em pacientes acometidos por esta doença.

3 OBJETIVO GERAL

Estabelecer o perfil diferencial de metilação de oito genes candidatos em tumores primários de células germinativas de testículo (seminomas e não seminomas) e em testículos normais.

3.1 Objetivos Específicos

1) comparar a frequência de metilação de oito genes candidatos entre as amostras de seminomas, não seminomas e testículos normais;

2) correlacionar o perfil de metilação dos genes candidatos com as características clínico-patológicas dos pacientes;

3) correlacionar o perfil de metilação dos genes candidatos com a sobrevida dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

No estudo foram incluídas 90 amostras de tumores de células germinativas de testículo emblocadas em parafina, de pacientes submetidos a orquiectomia no Hospital de Câncer de Barretos no período de 2005 a 2012. Essas amostras estavam estocadas no arquivo do Departamento de Patologia da instituição. Para cada caso, uma lâmina corada por hematoxilina-eosina (HE) foi analisada por um patologista para confirmação do diagnóstico e determinação das áreas correspondentes ao tecido tumoral, a fim de selecionar áreas para extração do material com >70% de celularidade tumoral e menor proporção possível de tecido normal. Além disso, foram incluídas 25 amostras de parafina de testículo normal provenientes de pacientes submetidos a cirurgia de castração como parte no tratamento de tumores de próstata, no mesmo período.

Após a determinação do patologista, foram feitos cortes de 10 µm de espessura dos blocos de parafina para a confecção das lâminas e utilizado aproximadamente quatro cortes para a extração do DNA genômico.

Ainda, foi incluído neste estudo uma amostra de DNA de linfócito normal obtida a partir da coleta de sangue periférico em tubo *Vacutainer® EDTA*, que foi utilizado como molde para a metilação *in vitro* e, posterior construção da curva padrão.

4.1.1 Critério de inclusão das amostras tumorais

Foram incluídos pacientes com idade maior de 18 anos ao diagnóstico correspondente a tumor de célula germinativa de qualquer histologia, atendidos no Hospital de Câncer de Barretos no período de 2005 à 2012, submetidos aos procedimentos cirúrgicos e/ou à quimioterapia.

4.1.2 Critério de exclusão das amostras tumorais

Foram excluídos todas as amostras com baixa qualidade para extração do material e amostras com quantidades insuficientes para a conversão por bissulfito.

4.2 Genes alvo selecionados

Um total de oito genes foram selecionados para a análise do perfil de metilação de suas regiões promotoras. Dentre eles, quatro (*MGMT*, *VGF*, *HOXA9* e *NANOG*) já foram avaliados em tumores de células germinativas e os outros quatro (*CALCA*, *CDKN2B*, *CDO1* e *ADAMTS1*) são frequentemente hipermetilados em outros tipos tumorais. Todos os genes apresentam características de supressores tumorais.

4.3 Extração de DNA de material parafinado

Após a identificação das amostras, todas as lâminas histológicas originais passaram por uma etapa inicial de desparafinização com incubação das lâminas por vinte minutos em estufa a 80°C, seguidas de dois banhos de xilol 100% por 5 minutos e três banhos de etanol 100%, 70% e 50% respectivamente por um minuto cada, com o objetivo de remover totalmente a parafina das amostras. Em seguida, as lâminas foram imersas em água destilada, para a remoção total dos resíduos de parafina e mantidas na água até o início da próxima etapa.

Em seguida, a macrodissecção manual por raspagem da área tumoral foi realizada com agulha (18G x 11/2), seguindo como modelo a lâmina de HE analisada e marcada pelo patologista. O DNA genômico foi extraído pelo kit *QIAamp DNA Micro Kit* (Qiagen) específico para amostras de tecido parafinado, seguindo protocolo do fabricante. Após a raspagem, foi adicionado proteinase K para digestão dos tecidos e incubação *overnight* à temperatura de 56°C em termomixer a 700 RPM. Em seguida realizou-se a inativação da proteinase K com uma incubação a 98°C por uma hora. Seguindo o protocolo do kit, o lisado foi transferido para a coluna com membranas de sílica e a extração ocorreu pela centrifugação do homogeneizado nas colunas, as quais atraem o DNA devido a diferença de cargas elétricas, pela lavagem com tampões contendo etanol para a purificação do material. Na última etapa, o conteúdo da coluna foi eluído em 60 µL de água estéril deionizada (milliQ).

4.3.1 Extração do DNA de sangue periférico

A partir da amostra coletada, o tubo *Vacutainer*® EDTA foi centrifugado a 3.500 RPM, por 10 minutos à 4°C para a obtenção de um anel leucocitário ou *buffycoat*. Aproximadamente, 500 µL do *buffycoat* foram transferidos para um tubo Falcon de 15 mL. A lavagem de hemácias foi realizada previamente ao início da extração, para obtenção de um

pellet de leucócitos livre de hemácias. Essa lavagem ocorreu pela adição de 12 mL de solução de lise composta por Cloreto de amônio (10X) e Bicarbonato de amônio (1X) ao tubo Falcon que foi posteriormente imerso no gelo por 20 minutos. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3.500 RPM a 4°C, e o *pellet* transferido para um microtubo de 1,5 mL. O DNA foi extraído através do *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen), adicionando 25 µL de proteinase K ao *pellet*, 4 µL de RNase A e 200 µL de tampão de lise, conforme protocolo do fabricante. A amostra foi incubada a 56°C por 3 horas com agitação de 600 RPM em termomixer. Após a incubação, foi adicionado 200 µL de etanol absoluto e o conteúdo do tubo transferido para a coluna fornecida pelo fabricante. O protocolo seguiu com a lavagem da coluna com solução tampão, e o conteúdo eluído em 60 µL de água estéril deionizada (milliQ). O DNA foi posteriormente quantificado e armazenado em freezer a uma temperatura de -20°C.

4.4 Quantificação do DNA

Para quantificar as amostras após a extração, foi utilizado o espectrofotômetro *Nanodrop 2000C* (ThermoScientific). Este aparelho quantifica ácidos nucleicos e proteínas, através da leitura de comprimento de onda absorvido ou refletido. A absorbância de 260nm indica o pico de absorção de UV do DNA, a absorbância de 280nm o pico de absorção de UV de proteínas e 230nm o pico de absorção de UV para contaminantes orgânicos.

Assim, com o cálculo das razões 260/280 e 260/230 é possível verificar a pureza do material em análise. Quanto mais pura a amostra, ou seja, quanto menos proteínas ou solventes orgânicos provenientes da extração, maior será essa razão. Utiliza-se o valor de referência 1,8 para a pureza do DNA. Todas as amostras foram quantificadas com o volume de 1 µL, e estavam dentro dos limites das razões aceitáveis para trabalhar com o DNA (entre 1,7 e 2,2). Todas as amostras foram estocadas à -20°C.

4.5 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio

O DNA genômico extraído a partir das amostras foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio pelo *EZ DNA Methylation Kit* (ZymoResearch). O tratamento consiste em converter as citosinas não metiladas em uracila através da perda do grupo amina da base citosina (Figura 2). Já as citosinas metiladas ficam protegidas e portanto permanecem

inalteradas. Com a utilização deste método, a taxa de conversão química tem sido estimada em 95-98% (Clark *et al.* 2006).

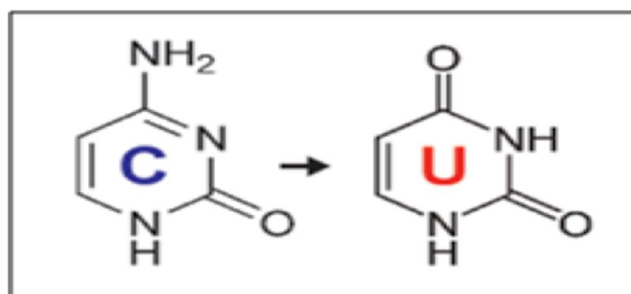


Figura 2. Perda do grupo amina da base citosina.

O tratamento consiste em uma primeira etapa de desnaturação do DNA, uma segunda etapa de tratamento com bissulfito de sódio (deaminação) e uma terceira etapa de purificação, dessulfonação e eluição. A quantidade de 2µg do DNA genômico foi utilizado para o tratamento, seguindo as instruções do fabricante.

Como a deaminação por bissulfito ocorre somente em fita simples do DNA, a etapa de desnaturação é primordial para a garantia da conversão, pois a presença de citosinas em fragmentos de fita dupla protegem as mesmas da deaminação. Portanto, inicialmente, para a desnaturação da fita dupla de DNA foi adicionado aos 2µg de amostra, 1X do tampão de diluição, em um volume final de 50 µL e colocados em incubação a 37°C por 15 minutos. Na etapa de conversão, as amostras foram incubadas a 50°C com o reagente de conversão CT (*EZ DNA Methylation Kit*) que contém bissulfito de sódio, por 16 horas protegidos de luz. Na etapa de purificação, as amostras foram transferidas para a coluna *Zymo-Spin* contendo o tampão de ligação e centrifugadas por 30 segundos a 13.000 RPM, seguido de adição de tampão de lavagem e nova centrifugação. Na próxima etapa, foi adicionado o tampão de dessulfonação a coluna, e o produto incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Na última etapa de eluição, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e foram adicionados 20 µL de água estéril deionizada (milliQ) com incubação de 1 minuto, por duas vezes, para obtenção máxima do rendimento da coluna, totalizando 40 µL finais de produto eluído, então armazenados em freezer -80°C (Figura 3).

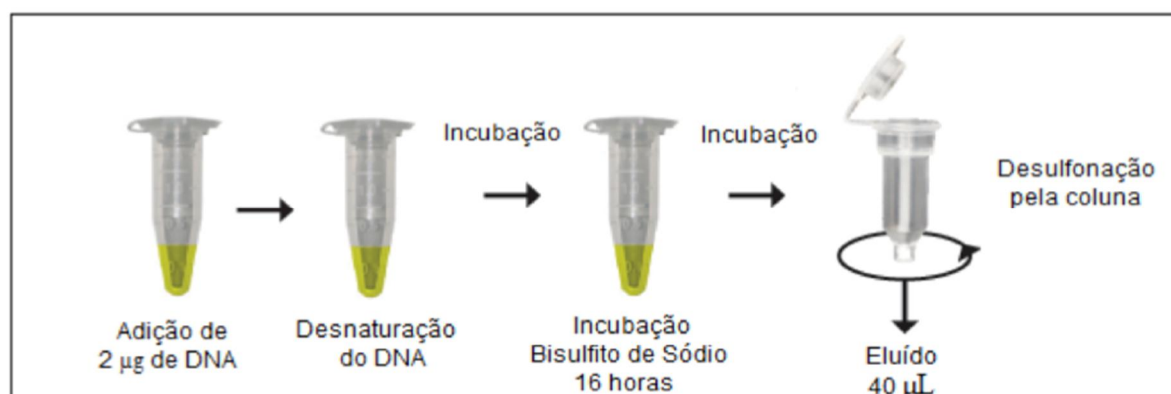


Figura 3. Conversão por bissulfito de sódio pelo kit *EZ DNA Methylation Kit* (ZymoResearch).

4.6 Metilação do DNA de leucócitos *in vitro*

O DNA genômico de leucócitos normais metilado *in vitro* foi empregado na construção das curvas padrão da PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP). A metilação *in vitro* do DNA genômico foi realizada utilizando o kit *CpG Methyltransferase-M.SssI* (New England Biolabs), seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, adicionou-se em um tubo 20 µg de DNA de leucócitos previamente extraídos de sangue periférico com 2,5 µL de S-adenosilmetionina (SAM) a 32 mM, 25 unidades de *SssI* metilase, 25 µL de tampão NEB 10x e água ultra-pura na quantidade suficiente para 250 µL, e incubado a 37°C por 4 horas. Após a incubação, foram adicionados mais 5 µL de SAM e 12,4 unidades da *SssI* metilase, e nova incubação a 37°C por 4 horas.

Foi adicionado 250 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e transferidos para um tubo *PhaseLock Gel* (Eppendorf), e centrifugado por 15 minutos a 13.000 RPM. A fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionados 800 µL de etanol 100%, 100 µL de acetato de amônio 7,5 M, homogeneizado por inversão e incubado a -20°C *overnight*. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de etanol 70% e homogeneizado por inversão. Em seguida centrifugado por dois minutos a 8.000 RPM, retirado o sobrenadante e o *pellet* foi seco a temperatura ambiente.

O *pellet* de DNA foi ressuspendido em 11µL de água estéril deionizada (milliQ), quantificado e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrito anteriormente. Após a conversão do DNA genômico 100% metilado, foram aliqüotadas as

curvas padrão, constituídas de seis pontos de diluições seriadas (fator de diluição 1:10), partindo de 50 ng de DNA 100% metilado e armazenadas na temperatura -80°C.

4.7 Desenho de iniciadores e sondas específicos

O desenho dos iniciadores é uma etapa importante, pois a confiabilidade desse método depende da escolha de regiões do promotor que contenham ilhas CpG e que possam ser reconhecidas pelos iniciadores quando estiverem metiladas.

O objetivo de desenhar iniciadores para análise de metilação quantitativa é amplificar sequências metiladas com eficiência, evitando a amplificação de sequências não convertidas. Incluir bases originalmente presentes como citocinas na extremidade 3' dos iniciadores assegura que qualquer sequência não convertida não seja amplificada.

Os iniciadores e sondas que foram utilizados para amplificar a região promotora dos genes de interesse e do gene de referência (*ACTB*) estão descritos na tabela 2. Para seis destes oito genes, incluindo *ACTB*, as sequências foram descritas por outros autores^{38, 60, 66-69}. Para os genes *NANOG* e *ADAMTS1* os iniciadores e sondas foram desenhados seguindo os critérios estabelecidos por Eads et al⁶⁶.

Além disso, com exceção do *NANOG*, todos os genes apresentam ilha CpG em suas regiões promotoras (<http://www.genome.ucsc.edu>). Para o gene *NANOG* foi avaliada uma região densa em CpG localizada na região promotora.

Para localização das sequências dos iniciadores e sondas destes genes, e também para a visualização das ilhas CpG foram utilizadas as ferramentas: "*Human Blat Search*"⁷⁰ e "*MethPrimer*"⁷¹.

Tabela 2 - Iniciadores e sondas para avaliação do perfil de metilação da região promotora dos genes alvo avaliados.

Gene	Direto 5'-3' (Iniciador)	Sonda 5'-3' (6-FAM-5'-3'-IowaBlack)	Reverso 5'-3' (Iniciador)	T°C	Amplicon (pb)	Referência
<i>ACTB</i>	TGGTGATGGAGGAGTTTGTAGTAAGT	ACCACCAACCAACACACAATAACAACACACA	AACCAATAAAACCTACTCTCCCTTAA	60	133	66
<i>VGF</i>	GGATAGCGTTCTGAGGCG	GCGCCCAAAAACGACGTAAACCTAAATAC	AAAAACCGAATTCACACCCCG	60	93	49
<i>MGMT</i>	CGAATATACTAAACACCCGCG	AATCCTCGGATACGACCGTTTACG	GTATTTTTTCGGGAGCGAGGC	60	122	38
<i>ADAMTS1</i>	TAGGGTGCGTTATCGG	CGCCCTCTTCGACCTCCGC	TCTAAACGCTCCGAA	60	129	-
<i>CD01</i>	CCACAACGACGAAAATAAACG	TTAACGCGCGTTTTAGTCGTTTCG	TCGGCGTTTTAGGGATCGCG	60	109	68
<i>HOXA9</i>	AATAAATTTTATCGTAGAGCGGTAC	GCGCCCCATTAAACCGTACGCGT	CATATAACAACCTAATAACACCGAA	60	226	67
<i>CALCA</i>	GTTTTGGAAGTATGAGGGTGACG	ATTCCGCCAATACACAACCAATAAACG	TTCCCGCCGCTATAAATCG	60	101	69
<i>CDKN2B</i>	AGGAAGGAGAGAGTGCCTCG	TTAACGACACTCTCCCTCTTCCACG	CGAATAATCCACCGTAAACCG	60	81	69
<i>NANOG</i>	TTGAGACGTAGTTTCGTT	CAAAAATTATAATAAACCGATATCGCGCCAC	AACCTACTCTAAAACTAAAACGA	60	117	-

4.8 Análise de PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP)

A técnica escolhida para avaliar os níveis de metilação é uma técnica quantitativa, que permite analisar a amplificação em tempo real do produto. Nesta abordagem, foram utilizados iniciadores e uma sonda específica, marcada por um fluoróforo *reporter* (6-carboxi-fluoresceína-FAM) na extremidade 5' e um *quencher* (Iowa Black) na extremidade 3'.

O *reporter* é um emissor de fluorescência, a qual é captada pelo *quencher* devido a proximidade entre ambos quando a sonda encontra-se intacta. Durante a fase de extensão da reação de PCR, a atividade 5' exonuclease da *Taq DNA Polimerase* lisa a sonda, separando o *reporter* do *quencher*, e assim a fluorescência emitida pode ser captada pelo aparelho. Portanto o nível de fluorescência detectado é proporcional à quantidade de produto amplificado.

O DNA modificado com bissulfito foi utilizado como molde para PCR quantitativa em tempo real. As reações de amplificação foram efetuadas num volume final de 20 µL, nas seguintes condições: 1 µL (~50 ng) de DNA genômico modificado com bissulfito; 600 nM de iniciadores direto e reverso, 200 nM de sonda; 0,6 unidades de *platinumTaq DNA polimerase* (Invitrogen); 200 µM de dNTPs; 2 µL de tampão de reação caseiro 10X (contendo sulfato de amônio 166 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 670 mM, cloreto de magnésio 67 mM, β-mercaptoetanol 100 mM, DMSO 1%) e 0,4 µL de *ROX ReferenceDye* (Invitrogen), que atua como um normalizador da fluorescência.

As reações foram realizadas seguindo as condições: 95°C durante 3 minutos, seguido de 50 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. Exceto para o gene *NANOG*, em que a temperatura de ligação dos iniciadores foi de 58°C obtendo uma maior eficiência.

Antes da realização das reações de QMSP, foram realizadas as padronizações de todos os conjuntos de iniciadores e sondas, para verificar e estabelecer a temperatura ótima da reação.

As reações foram feitas em placas de 96 poços no *ABI 7900HT Fast Real-Time PCR system* (Applied Biosystems) e as corridas analisadas com o auxílio do programa *SDS2.4* (Applied Biosystems). Cada placa continha amostras de pacientes normais e tumorais em triplicata, e três controles negativos em que adicionou-se água no lugar do DNA molde. Além das amostras, cada placa também continha 11 poços destinados a curva padrão construída a partir da diluição seriada do DNA de leucócitos de indivíduo normal metilado *in vitro* como

descrito anteriormente. Para se obter a quantidade de DNA total na reação, o gene *ACTB* foi utilizado como referência interna e seus iniciadores e sonda foram desenhados em região que não contém dinucleotídeos CpG, o que possibilitou a amplificação tanto de DNA metilado como não metilado. Dessa forma, foi possível inferir a quantidade total de DNA colocada na reação, o que serviu posteriormente para a normalização e determinação dos níveis de metilação dos oito genes avaliados.

Para as reações foram adotados os seguintes critérios: as amostras foram consideradas metiladas quando foi possível detectar a amplificação de pelo menos duas das triplicatas. Nos casos em que apenas uma das triplicatas era amplificada, os experimentos foram repetidos e consideradas metiladas caso o resultado fosse confirmado. A ausência de amplificação indicava que a amostra não era metilada. Além disso, para utilizar a curva padrão na quantificação da metilação nas amostras, consideramos o mínimo de três pontos com sinal de amplificação (Figura 4). As reações foram repetidas quando isso não foi observado.

O nível relativo de DNA metilado para cada gene em cada amostra foi determinado como a razão entre as médias das triplicatas do gene de interesse dividido pelo valor da média das triplicatas da amostra em questão para *ACTB*, e então este valor multiplicado por 1000, para a melhor representação dos dados.

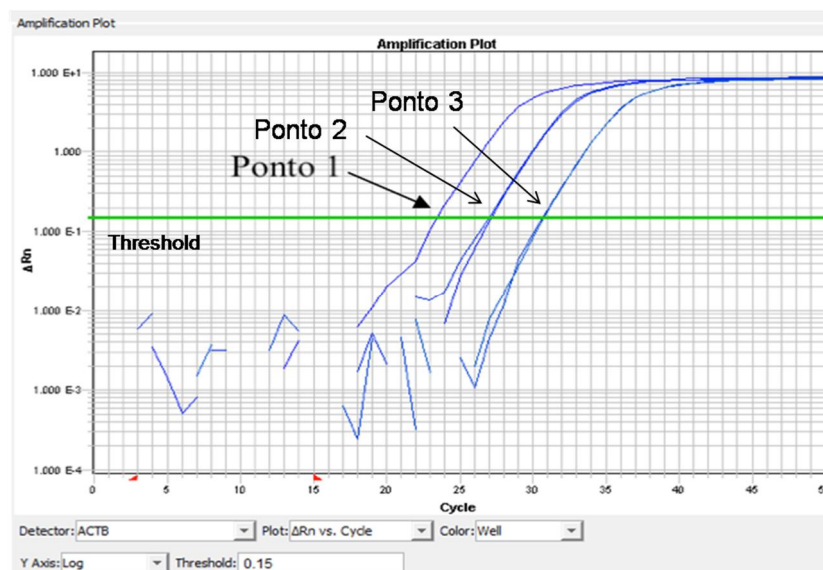


Figura 4. Amplificação dos três primeiros pontos da curva controle para o gene *ACTB*. A reta verde, conhecida como *threshold* é um valor numérico definido em cada reação, que indica o ponto em que o nível de fluorescência encontra-se acima da fluorescência basal.

4.9 Purificação do produto de PCR para sequenciamento

Para o sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega). Seguindo protocolo do fabricante, os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% com tampão TAE 1X, e submetidos a uma corrida de eletroforese a 100V e 400mA por 50 minutos. Com o auxílio do transiluminador UV, as bandas foram cortadas com um bisturi, colocadas em um tubo de 1,5 mL e pesadas em balança científica. O tamanho esperado dos fragmentos amplificados para cada gene pode ser observado na tabela 1.

De acordo com o peso obtido de cada fragmento do gel, foi adicionado o tampão de ligação numa razão de 10 µL da solução a cada 10 mg do gel, e então foram incubados a 60°C por 10 minutos até dissolução completa do gel. O gel dissolvido foi transferido para a coluna SV com o tubo coletor e centrifugada a 14.000 RPM por um minuto. A coluna foi lavada com a adição do tampão de lavagem contendo etanol por duas vezes, o produto foi precipitado, e posteriormente eluído em 50 µL de água ultra-pura, e armazenado a -20°C.

4.10 Sequenciamento

Para avaliar a eficiência do tratamento por bissulfito das amostras de DNA foram utilizados os produtos da PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP) purificados.

O sequenciamento dos produtos tratados por bissulfito de sódio fornece base qualitativa e eficiente para identificar a citosina metilada. Esse método foi introduzido primeiramente por Frommer et al.⁷² e baseia-se nas reações de deaminação da citosina após o tratamento⁷³.

Os produtos de PCR foram purificados com 2 µL da enzima *Exo SAP-IT* (USB) a cada 5µL do produto da PCR purificado do gel. A reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos, seguido de 15 minutos a 80°C.

A partir das amostras tratadas com *Exo SAP*, foi adicionado 1 µL de reagente *Big Dye*, 1,5 µL de tampão 5X do *kit DNA Sequencing BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) e 1 µL do iniciador empregado na amplificação (3,2 µM). Para análise da eficiência da conversão por bisulfito foi utilizado o iniciador direto de *ACTB*. O volume final da reação foi de 10 µL. A reação final foi incubada em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) por 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4

minutos. Após a ciclagem utilizou-se *Big Dye X-Terminator Purification Kit* (Applied Biosystems). Essa etapa teve como objetivo purificar o produto das reações de sequenciamento mediante o uso de 10 µL de *X-Terminator Solution* – que captura os dNTPs e os íons de sal não incorporados durante a reação de sequenciamento - e 45 µL de *SAM Solution* – que potencializa a performance do *X-Terminator Solution* e estabiliza a amostra após a purificação. Finalmente, os produtos da PCR foram sequenciados utilizando o equipamento *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.11 Análise estatística

As variáveis contínuas foram apresentadas como médias, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo. As variáveis categóricas foram apresentados pelas frequências e porcentagens.

Inicialmente, a metilação dos genes foi tratada como uma variável contínua e foi realizada a comparação dos seus níveis entre casos e controle através do teste de Mann-Whitney.

Posteriormente, para categorizar a metilação dos genes foi determinado um ponto de corte utilizando a curva ROC e, considerado o melhor ponto, aquele que apresentou a melhor sensibilidade e especificidade na comparação entre casos e controles. Para a avaliação desse ponto, foram analisados a área sob a curva (AUC), a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. A mesma análise foi repetida considerando o desfecho para a ocorrência de um evento, somente para os casos.

Após essa análise, a metilação dos genes foi relacionada com as características clínicas dos pacientes, através do Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. Posteriormente, a relação (conjunta) das características clínicas em relação a cada gene foi realizada através de regressão logística múltipla. Para isso, foram selecionadas apenas aquelas variáveis que apresentaram $p < 0,2$ no teste anterior.

A sobrevida global e sobrevida livre de eventos foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier. Para a sobrevida global, foi considerado como evento o óbito por qualquer causa, sendo o tempo de acompanhamento a data de diagnóstico até a data do óbito. Para a sobrevida livre de eventos, foi considerado como evento: progressão, recidiva ou óbito, sendo o tempo de acompanhamento a data do diagnóstico até a data do evento que ocorreu.

primeiro. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foi feita através do teste de *Log-Rank*.

Posteriormente, a relação (conjunta) das características clínicas e moleculares em relação a sobrevivência foi realizada através da regressão de COX múltipla. Para isso, foram selecionadas apenas aquelas que obtiveram $p < 0,2$ no teste anterior.

Em todo o estudo foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS v.21.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da eficiência da conversão do DNA genômico pelo tratamento com bissulfito de sódio

Das 90 amostras tumorais e 25 amostras controle iniciais, 72 amostras de TCGT e 23 controles foram submetidos à conversão por bissulfito de sódio. A exclusão das amostras aconteceu principalmente no momento da extração, com resultados de qualidade abaixo do estabelecido e quantidade insuficiente para a conversão por bissulfito.

Para as amostras incluídas no estudo, após a conversão com bissulfito de sódio, 12 amostras aleatórias foram submetidas ao sequenciamento com o objetivo de verificar a eficiência da conversão e a validação para a análise da metilação. O fragmento referente ao gene *ACTB* foi analisado (iniciador direto), com atenção às bases citosinas que por não estarem metiladas (setas pretas) foram convertidas totalmente em timina, demonstrando dessa forma a eficiência do tratamento (Figura 5).

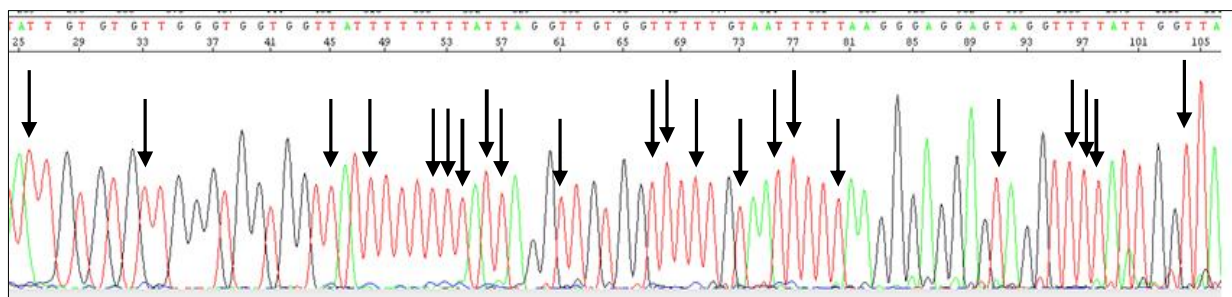


Figura 5. Sequenciamento do gene *ACTB* após a conversão por bissulfito de sódio. Eletroferograma representando o sequenciamento do fragmento avaliado para o gene controle *ACTB*. As setas indicam uma base timina, originalmente uma citosina antes da conversão.

5.2 Características clínico-patológicas das amostras de TCGT

A população de casos tumorais do nosso estudo apresentou uma média de idade de 29,6 anos, com 58% dos casos com idade abaixo de 29,6 anos. A idade média para os casos normais foi de 63 anos. O predomínio da classificação histológica pertenceu ao grupo dos

não-seminomas (72,2%), dos quais 29,2% apresentaram-se como tumores mistos (compostos por dois ou mais componentes do grupo, exceto teratomas).

Em relação ao estadiamento, observamos um predomínio com 81,6% dos casos com estadiamento avançado (IS, II ou III). Ainda, 70,8% apresentaram metástase ao diagnóstico, avaliando os principais sítios acometidos: pulmão, fígado, ossos e gânglios. Para os marcadores séricos antes da orquiectomia, 46,7% dos casos foram classificados em S1, 38,3% em S2, 6,7% em S3 e 8,3% em S0. Em relação a quimiossensibilidade ao tratamento, 75,8% dos casos foram sensíveis e 24,2% refratários. Em relação aos casos avançados e classificados segundo IGCCCG, 67,8% dos casos foram considerados de baixo risco (Tabela 3).

Tabela 3 - Características clínicas das amostras tumorais (seminomas e não seminomas).

Características	Categorias	Número de pacientes (%)
Idade média	<29,6	42(58,3)
	≥29,6	30(41,7)
	Total	72(100)
Classificação	Seminoma	20(27,8)
	Não seminoma	52(72,2)
	Total	72(100)
Histologia	Seminoma	20(27,8)
	Carcinoma embrionário	10(13,9)
	Teratoma maduro	1(1,4)
	Teratoma imaturo	3(4,2)
	Seio endodérmico	5(6,9)
	TCG Misto	33(45,8)
	Total	72(100)
Estadiamento	I	10(13,9)
	IS / II / III	62(86,1)
	Total	72(100)
Metástase ao diagnóstico	Não	21(29,2)
	Sim	51(70,8)
	Total	72(100)
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5(8,3)
	S1	28(46,7)
	S2	23(38,3)
	S3	4(6,7)
	Total	60(100)
Quimiossensibilidade	Sensíveis	47(75,8)
	Refratários	15(24,2)
	Total	62(100)
Risco do tratamento (IGCCCG)	Baixo	40(67,8)
	Intermediário	13(22,0)
	Alto	6(10,2)
	Total	59(100)

5.3 Análise dos níveis de metilação dos genes alvo por meio da PCR metilação específica em tempo real (QMSP)

O nível de metilação dos genes foi determinado utilizando a técnica de QMSP como descrito anteriormente (item 4.8, material e método). Na figura 6, demonstramos o exemplo de uma reação de QMSP para o gene *CALCA*, na qual é estabelecido o *threshold* que vai determinar os pontos de quantificação (Cq) para a análise tanto na curva padrão quanto nas amostras avaliadas. A partir desta análise foi possível estabelecer o nível de metilação em cada amostra para cada gene avaliado. Na tabela 4, está representado o número de amostras amplificadas para cada gene.

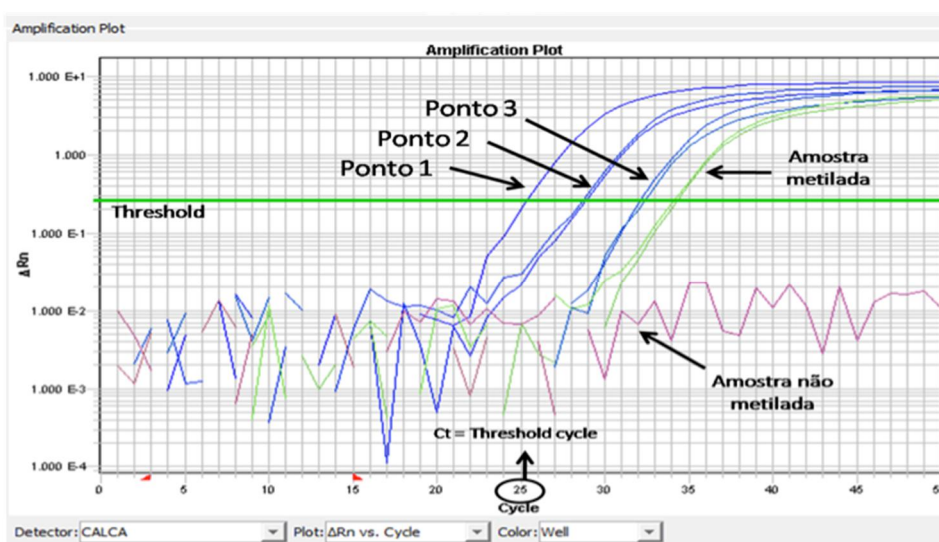


Figura 6. Reação de QMSP para o gene *CALCA*. Curva padrão com três pontos de diluição seriada- Ponto 1: amostra tratada *in vitro* sem diluição, Ponto 2: Amostra do Ponto 1 diluída em 9 µl de água e Ponto 3: amostra do Ponto 2 diluída em 9 µl de água ; uma amostra amplificada (metilada), e uma amostra sem amplificação (não metilada). O ciclo 25 determina o ponto em que a amplificação do primeiro ponto da curva padrão ultrapassou o *threshold*.

Tabela 4 - Número de amostras tumorais amplificadas para QMSP.

Genes	Amostras Amplificadas	
	Controle/ Total	Tumorais/Total
VGF	03 / 23	10 / 72
MGMT	18 / 23	28 / 72
ADAMTS1	0 / 23	03 / 71
CALCA	18 / 23	45 / 72
HOXA9	03 / 23	15 / 72
CDKN2B	21 / 23	58 / 72
CDO1	0 / 23	04 / 72
NANOG	10 / 15	27 / 64

5.4 Associação do nível de metilação dos genes com os fatores clínico-patológicos dos pacientes e análise de curva ROC.

Inicialmente, consideramos a metilação dos genes como uma variável numérica e comparamos a média dos níveis de metilação entre as amostras controle e os casos (Tabela 5). Como podemos observar na tabela 5, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre o nível médio de metilação dos genes quando comparados controles e casos para nenhum dos genes avaliados. Entretanto, podemos ressaltar que para o gene *MGMT* e *CALCA* o nível médio de metilação foi muito maior nos casos comparados aos controles.

Tabela 5 - Análise numérica da metilação dos genes entre casos e controles.

Gene	Grupo	Contagem	Média	Desvio padrão	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p valor
<i>VGF</i>	Controle	23	1,20	4,01	0,00	0,00	0,00	0,00	18,60	0,805
	Caso	72	23,60	104,56	0,00	0,00	0,00	0,00	701,86	
<i>MGMT</i>	Controle	23	4,58	4,18	0,00	1,40	4,59	7,02	15,52	0,067
	Caso	72	117,71	567,99	0,00	0,00	0,00	9,76	4665,23	
<i>ADAMTS1</i>	Controle	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,322
	Caso	72	7,05	43,40	0,00	0,00	0,00	0,00	332,71	
<i>CALCA</i>	Controle	23	17,53	46,79	0,00	0,27	5,34	10,42	225,87	0,076
	Caso	72	337,93	1502,65	0,00	0,00	35,32	104,77	12492,17	
<i>HOXA9</i>	Controle	23	0,52	1,51	0,00	0,00	0,00	0,00	6,33	0,269
	Caso	72	41,19	115,74	0,00	0,00	0,00	0,00	568,94	
<i>CDKN2B</i>	Controle	23	44,96	24,92	0,00	21,45	47,07	63,77	89,94	0,200
	Caso	72	41,91	45,06	0,00	16,10	33,89	59,08	315,42	
<i>CDO1</i>	Controle	23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,251
	Caso	72	46,24	208,28	0,00	0,00	0,00	0,00	1167,82	
<i>NANOG</i>	Controle	23	631,76	717,41	0,00	0,00	426,90	1207,86	2098,85	0,105
	Caso	72	683,14	1652,88	0,00	0,00	0,00	495,64	9514,98	

Posteriormente, consideramos a metilação como uma variável categórica, sendo para isso utilizado a análise de curva ROC (Tabela 6). Para cada gene, levando em consideração todas as nossas amostras (controles e casos) foi determinado o ponto de corte no nível de metilação que fosse capaz de discriminar com a maior sensibilidade e especificidade controles e casos. Para facilitar o entendimento, amostras que apresentaram nível de metilação abaixo deste ponto foram consideradas como não metiladas e amostras com nível de metilação acima deste ponto foram consideradas como metiladas (Tabela 7).

Tabela 6 - Análise da curva ROC para os genes avaliados.

Gene	Área abaixo da curva	Desvio Padrão	p-valor	IC 95%	
				Limite inferior	Limite superior
<i>VGF</i>	0,510	0,068	0,883	0,377	0,644
<i>MGMT</i>	0,618	0,060	0,089	0,500	0,737
<i>ADAMTS1</i>	0,521	0,068	0,764	0,388	0,654
<i>CALCA</i>	0,621	0,058	0,082	0,508	0,734
<i>HOXA9</i>	0,553	0,065	0,450	0,425	0,680
<i>CDKN2B</i>	0,589	0,064	0,202	0,464	0,714
<i>CDO1</i>	0,528	0,068	0,689	0,395	0,660
<i>NANOG</i>	0,624	0,079	0,135	0,470	0,779

Tabela7 - Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC para cada gene.

Gene	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
<i>VGF</i>	8,760	12,5 (6,7 - 22,1)	95,7 (79,0 - 99,2)	90,0 (59,6 - 98,2)	25,9 (17,8 - 36,1)	32,7 (24,0 - 42,6)
<i>MGMT</i>	1,290	65,3 (53,8 - 75,3)	78,3 (58,1 - 90,3)	90,4 (79,4 - 95,8)	41,9 (28,4 - 56,7)	68,4 (58,5 - 76,9)
<i>ADAMTS1</i>	0,042	4,2 (1,4 - 11,6)	100,0 (85,9 - 100,0)	100,0 (43,9 - 100,0)	25 (17,3 - 34,7)	27,4 (19,4 - 37,1)
<i>CALCA</i>	13,085	59,7 (48,2 - 70,3)	82,6 (62,9 - 93,0)	91,5 (80,1 - 96,6)	39,6 (27,0 - 53,7)	65,3 (55,3 - 74,1)
<i>HOXA9</i>	10,042	20,8 (13,1 - 31,6)	100,0 (85,7 - 100,0)	100,0 (79,6 - 100,0)	28,8 (20,0 - 39,5)	40,0 (30,7 - 50,1)
<i>CDKN2B</i>	42,732	59,7 (48,2 - 70,3)	60,9 (40,8 - 77,8)	82,7 (70,3 - 90,6)	32,6 (20,5 - 47,5)	60,0 (50,0 - 69,3)
<i>CDO1</i>	145,666	5,6 (2,2 - 13,4)	100,0 (85,9 - 100,0)	100,0 (51,0 - 100,0)	25,3 (17,5 - 35,1)	28,4 (20,3 - 38,2)
<i>NANOG</i>	78,843	60,9 (48,7 - 71,9)	66,7 (41,7 - 84,8)	88,6 (76,0 - 95,1)	28,6 (16,3 - 45,1)	62,1 (51,0 - 71,9)

Como podemos observar na Tabela 7, mesmo os melhores pontos de corte obtidos nesta análise não apresentaram uma alta sensibilidade, apesar da alta especificidade. Essa observação sugere que o nível de metilação destes genes não são bons marcadores para discriminar entre controles e casos tumorais. De qualquer forma, após a categorização das amostras e estabelecimento da frequência de metilação dos genes (Tabela 8) utilizando essa estratégia, a metilação dos genes foi associada com as características clínicas dos pacientes.

Tabela 8 - Frequência da metilação do promotor em TCGTs e nas amostras controle.

Genes	Cutoff*	Tumores com metilação/ total de tumores (% , 95% IC)	Controles com metilação/ total de controles (% , 95% IC)
<i>VGF</i>	8,760	09 / 72 (12,5, 0 - 48,17)	01 / 23 (4,4, 0 - 2,93)
<i>MGMT</i>	1,290	25 / 72 (34,8, 0 - 251,18)	18 / 23 (78,3, 2,77 - 6,39)
<i>ADAMTS1</i>	0,042	03 / 71 (4,2, 0 - 17,24)	0 / 23 (0,0, -)
<i>CALCA</i>	13,085	43 / 72 (59,7, 0 - 3868,1)	04 / 23 (17,4, 0 - 37,76)
<i>HOXA9</i>	10,042	15 / 72 (20,8, 13,99 - 68,38)	0 / 23 (0,0, 0 - 1,17)
<i>CDKN2B</i>	42,732	29 / 72 (40,3, 31,32 - 52,5)	14 / 23 (60,8, 34,18 - 55,73)
<i>CDO1</i>	145,666	04 / 72 (5,5, 0 - 95,2)	0 / 23 (0,0, -)
<i>NANOG</i>	78,843	25 / 64 (39,0, 294,73 - 1071,55)	10 / 15 (66,6, 321,52 - 942,0)

IC: Intervalo de confiança; * O ponto de corte (*cutoff*) foi determinado como o ponto que simultaneamente maximiza a sensibilidade e especificidade.

Nesta análise não foram observadas quaisquer associações estatisticamente significativas entre o perfil de metilação dos genes de interesse e as variáveis clínicas consideradas para os pacientes com TCGTs.

Sendo assim, optamos por mudar o foco de nossa análise. Em um cenário no qual uma vez estabelecido o diagnóstico de TCGT, nós avaliamos o impacto clínico do nível de metilação destes genes para o prognóstico destes pacientes. Assim, consideramos dois grupos de pacientes, aqueles para os quais não houve a ocorrência de eventos durante o curso clínico e aqueles para os quais houve a ocorrência de eventos, sendo considerado como evento o óbito, progressão ou recidiva do doença.

Baseado nesta nova abordagem, novamente consideramos a metilação dos genes como uma variável numérica e comparamos a média de metilação entre o grupo de pacientes sem e com ocorrência de eventos. Podemos observar na Tabela 9 um valor estatisticamente significativo para os eventos ocorridos em *CDO1*, e ainda podemos destacar a diferença da média dos níveis de metilação para ocorrência ou não de eventos para o *MGMT* e o gene *CALCA*.

Tabela 9 - Análise numérica da metilação dos genes para desfecho clínico.

Gene	Evento	N válido	Média	Desvio padrão	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p valor
<i>VGF</i>	Não	52	5,74	23,83	0,00	0,00	0,00	0,00	137,20	0,081
	Sim	20	70,05	190,22	0,00	0,00	0,00	1,81	701,86	
<i>MGMT</i>	Não	52	47,52	176,52	0,00	0,00	0,00	2,66	918,61	0,094
	Sim	20	300,20	1036,03	0,00	0,00	2,36	63,81	4665,23	
<i>ADAMTS1</i>	Não	52	3,13	22,55	0,00	0,00	0,00	0,00	162,59	0,127
	Sim	20	17,25	74,30	0,00	0,00	0,00	0,00	332,71	
<i>CALCA</i>	Não	52	101,11	235,94	0,00	0,00	34,08	74,67	1214,72	0,250
	Sim	20	953,68	2781,30	0,00	0,00	62,23	584,40	12492,17	
<i>HOXA9</i>	Não	52	39,16	106,82	0,00	0,00	0,00	0,00	498,69	0,929
	Sim	20	46,47	139,27	0,00	0,00	0,00	0,00	568,94	
<i>CDKN2B</i>	Não	52	46,45	50,14	0,00	16,10	39,31	62,34	315,42	0,183
	Sim	20	30,12	25,17	0,00	9,10	29,90	43,67	88,34	
<i>CDO1</i>	Não	52	5,60	40,40	0,00	0,00	0,00	0,00	291,32	0,028*
	Sim	20	151,91	376,10	0,00	0,00	0,00	0,00	1167,82	
<i>NANOG</i>	Não	47	613,80	1388,44	0,00	0,00	0,00	482,14	6092,80	0,356
	Sim	17	874,83	2271,97	0,00	0,00	54,18	958,93	9514,98	

Da mesma forma, uma nova análise de curva ROC foi realizada para cada gene, levando em consideração apenas as amostras tumorais, nas quais foi determinado o ponto de corte no nível de metilação que fosse capaz de discriminar com a maior sensibilidade e especificidade os pacientes com esses diferentes desfechos clínicos (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise da curva ROC para os genes avaliados.

Gene	Área abaixo da curva	Desvio Padrão	p-valor	IC 95%	
				Limite inferior	Limite superior
<i>VGF</i>	0,580	0,079	0,294	0,425	0,736
<i>MGMT</i>	0,613	0,079	0,141	0,457	0,768
<i>ADAMTS1</i>	0,540	0,079	0,597	0,386	0,694
<i>CALCA</i>	0,586	0,086	0,263	0,418	0,753
<i>HOXA9</i>	0,495	0,077	0,950	0,345	0,645
<i>CDKN2B</i>	0,601	0,070	0,185	0,463	0,739
<i>CDO1</i>	0,567	0,080	0,382	0,411	0,723
<i>NANOG</i>	0,568	0,082	0,407	0,408	0,728

A partir desta nova análise, foram estabelecidos novos pontos de corte para a classificação dos casos como metilados ou não metilados para os genes avaliados (Tabela 11), como descrito anteriormente.

Tabela 11 - Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC para cada gene.

Gene	Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
VGF	1,810	25,0 (8,7 - 49,1)	90,4 (79,0 - 96,8)	50,0 (18,9 - 81,1)	75,8 (63,3 - 85,8)	72,2 (61,0 - 81,2)
MGMT	3,700	50,0 (27,2 - 72,8)	76,9 (63,2 - 87,5)	45,5 (24,4 - 67,8)	80,0 (66,3 - 90,0)	69,4 (58,1 - 79,0)
ADAMTS1	6,150	10,0 (1,5 - 31,7)	98,1 (89,7 - 99,7)	66,7 (11,6 - 94,5)	73,9 (61,9 - 83,7)	73,6 (62,4 - 82,4)
CALCA	84,280	50,0 (27,2 - 72,8)	78,9 (65,3 - 88,9)	47,6 (25,7 - 70,2)	80,4 (66,9 - 90,2)	70,8 (59,5 - 80,1)
HOXA9	14,640	20,0 (5,9 - 43,7)	80,8 (67,5 - 90,4)	28,6 (8,6 - 58,1)	72,4 (59,1 - 83,3)	63,9 (52,4 - 74,0)
CDKN2B	33,005	65,0 (40,8 - 84,5)	57,7 (43,2 - 71,3)	37,1 (21,5 - 55,1)	81,1 (64,8 - 92,0)	59,7 (48,2 - 70,3)
CDO1	145,660	15,0 (3,4 - 37,9)	98,1 (89,7 - 99,7)	75,0 (20,3 - 95,9)	75,0 (63,0 - 84,7)	75,0 (63,9 - 83,6)
NANOG	34,560	52,9 (27,9 - 77,0)	63,8 (48,5 - 77,3)	34,6 (17,3 - 55,7)	79,0 (62,7 - 90,4)	54,2 (42,7 - 65,2)

Como podemos observar na tabela 11, não houve melhora significativa na sensibilidade, contudo, da mesma forma como na análise anterior a partir da definição dos pontos de corte a metilação de cada gene foi categorizada para cada amostra, sendo esse perfil de metilação associado as características clínicas dos pacientes. A partir deste ponto de corte temos para cada gene o seguinte perfil de metilação em relação as 72 amostras de casos tumorais (Tabela 12).

Tabela 12 - Número de casos metilados após estabelecer o ponto de corte pela curva ROC.

		Ocorrência de Eventos	
		Não	Sim
Genes	Cutoff*	Tumores com metilação/ total de tumores (%; 95% IC)	Tumores com metilação/ total de tumores (%; 95% IC)
VGF	1,810	05 / 52 (9,6, 0 - 12,37)	05 / 20 (25,0, 0 - 159,1)
MGMT	3,700	12 / 52 (23,1, 0 - 96,66)	10 / 20 (50,0, 0 - 785,1)
ADAMTS1	6,150	01 / 52 (1,9, 0 - 9,4)	02 / 20 (10,0, 0 - 52,0)
CALCA	84,280	11 / 52 (21,1, 35,42 - 166,8)	10 / 20 (50,0, 0 - 2255,4)
HOXA9	14,640	10 / 52 (19,3, 9,42 - 68,9)	04 / 20 (20,0, 0 - 111,7)
CDKN2B	33,005	30 / 52 (57,7, 34,5 - 60,4)	07 / 20 (35,0, 18,4 - 41,9)
CDO1	145,660	01 / 52 (1,9, 0 - 16,9)	03 / 20 (15,0, 0 - 327,9)
NANOG	34,560	17 / 47 (36,2, 206,1 - 1020,5)	9 / 17 (53,0, 0 - 2042,9,0)

IC: Intervalo de confiança; * O ponto de corte (*cutoff*) foi determinado como o ponto que simultaneamente maximiza a sensibilidade e especificidade.

5.5 Associação do perfil de metilação dos genes com os fatores clínico-patológicos dos pacientes.

Uma vez que foram estabelecidos os pontos de corte para cada gene e determinado o padrão de metilação de cada amostra, esse perfil de metilação foi associado as

características clínicas e patológicas dos pacientes. Os resultados obtidos nesta análise serão demonstrados a seguir, gene a gene.

5.5.1 Gene *VGF*

Para o gene *VGF*, foi observada uma associação entre a metilação e o nível de marcadores séricos elevados. Para os pacientes que apresentaram o *VGF* metilado, 30% tem os marcadores séricos elevados em S3 comparado a 2% dos pacientes não metilados. Ainda, nenhum paciente com os marcadores dentro dos níveis da normalidade (S0) apresentou metilação do gene (Tabela 13).

Apesar de não significativo, podemos destacar que dos casos metilados para *VGF*, 100% apresentaram estadiamento avançado da doença (IS, II ou III) e 40% foram refratários ao tratamento comparados a 17,7% dos não metilados (Tabela 13).

Na análise de regressão logística múltipla, não observamos nenhum resultado estatisticamente significativo para as variáveis avaliadas.

Tabela 13 - Associação do perfil de metilação do gene *VGF* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		VGF		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	35 (56,5)	7 (70,0)	0,261
	≥29,6	27 (43,5)	3 (30,0)	
Classificação histológica	Seminoma	18 (29,0)	2 (20,0)	0,554
	Não seminoma	44 (71,0)	8 (80,0)	
Histologia em categorias	Seminoma	18 (29,0)	2 (20,0)	0,573
	Carcinoma embrionário	9 (14,5)	1 (10,0)	
	Teratoma maduro	1 (1,6)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	3 (4,8)	0 (0,0)	
	Seio endodérmico	3 (4,8)	2 (20,0)	
	TCG misto	28 (45,2)	5 (50,0)	
Estadiamento	I	10 (16,1)	0 (0,0)	0,171
	IS / II / III	52 (83,9)	10 (100,0)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5 (10,0)	0 (0,0)	0,039*
	S1	24 (48,0)	4 (40,0)	
	S2	20 (40,0)	3 (30,0)	
	S3	1 (2,0)	3 (30,0)	
Metástase ao diagnóstico	Não	19 (30,6)	2 (20,0)	0,492
	Sim	43 (69,4)	8 (80,0)	
Número de sítios de metástase	0	19 (30,6)	2 (20,0)	0,221
	1	30 (48,4)	4 (40,0)	
	2	11 (17,7)	2 (20,0)	
	3	2 (3,2)	2 (20,0)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	34 (68,0)	6 (66,7)	0,308
	Intermediário	12 (24,0)	1 (11,1)	
	Alto	4 (8,0)	2 (22,2)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	41 (78,8)	6 (60,0)	0,203
	Refratários	11 (21,2)	4 (40,0)	

*p-valor <0,05

5.5.2 Gene *MGMT*

Para o gene *MGMT*, uma associação significativa foi encontrada para a classificação histológica dos tumores, sendo que 90,9% dos casos metilados pertenciam ao grupo dos não seminomas em relação a 64% dos não metilados. Um valor próximo à significância foi observado para a quimiossensibilidade dos casos, sendo que tumores metilados eram mais refratários ao tratamento e tumores não metilados apresentaram maior sensibilidade. (Tabela 14).

A análise de regressão logística múltipla revelou que a metilação do gene *MGMT* está associada significativamente ao grupo de tumores não seminomas, independente de

qualquer outra característica. Podemos observar que pacientes com tumores não seminomas tem 5,62 vezes mais chance de apresentar este gene metilado (Tabela 15).

Tabela 14 - Associação do perfil de metilação do gene *MGMT* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		<i>MGMT</i>		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	27 (54,0)	15 (68,2)	0,261
	≥29,6	23 (46,0)	7 (31,8)	
Classificação histológica	Seminoma	18 (36,0)	2 (9,1)	0,019*
	Não seminoma	32 (64,0)	20 (90,9)	
Histologia em categorias	Seminoma	18 (36,0)	2 (9,1)	0,115
	Carcinoma embrionário	6 (12,0)	4 (18,2)	
	Teratoma maduro	1 (2,0)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	1 (2,0)	2 (9,1)	
	Seio endodérmico	3 (6,0)	2 (9,1)	
	TCG misto	21 (42,0)	12 (54,5)	
Estadiamento	I	8 (16,0)	2 (9,1)	0,713
	IS / II / III	42 (84,0)	20 (90,9)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	3 (7,3)	2 (10,5)	0,672
	S1	21 (51,2)	7 (36,8)	
	S2	15 (36,6)	8 (42,1)	
	S3	2 (4,9)	2 (10,5)	
Metástase ao diagnóstico	Não	14 (28,0)	7 (31,8)	0,743
	Sim	36 (72,0)	15 (68,2)	
Número de sítios de metástase	0	14 (28,0)	7 (31,8)	0,118
	1	27 (54,0)	7 (31,8)	
	2	8 (16,0)	5 (22,7)	
	3	1 (2,0)	3 (13,6)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	30 (73,2)	10 (55,6)	0,134
	Intermediário	9 (22,0)	4 (22,2)	
	Alto	2 (4,9)	4 (22,2)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	34 (82,9)	13 (61,9)	0,067
	Refratários	7 (17,1)	8 (38,1)	

*p-valor <0,05

Tabela15 - Regressão logística múltipla para o gene *MGMT*.

Variável	Categoria	Exp(B)	IC 95%		p-valor
			LI	LS	
Tipo histológico	Seminoma	1	--	--	0,030
	Não seminoma	5,625	1,177	26,877	
Constante		0,111	--	--	0,003

5.5.3 Gene *ADAMTS1*

Para o gene *ADAMTS1* foi observado uma associação significativa entre a ocorrência de metástases em mais de 3 sítios e o padrão de metilação do gene. Dos pacientes metilados, 66,7% apresentaram metástase em três sítios distintos em relação a 2,9% dos não metilados. Em relação ao risco segundo IGCCCG, uma associação significativa foi encontrada para o risco intermédio e alto concentrando 100% dos casos metilados, enquanto mais de 70% dos casos não metilados foram classificados como baixo risco (Tabela 16).

Na análise de regressão logística múltipla, não observamos nenhum resultado estatisticamente significativo para as variáveis avaliadas (Tabela 17).

Tabela - 16 -Associação do perfil de metilação do gene *ADAMTS1* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		<i>ADAMTS1</i>		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	40 (58,0)	2 (66,7)	0,999
	≥29,6	29 (42,0)	1 (33,3)	
Classificação histológica	Seminoma	20 (29,0)	0 (0,0)	0,555
	Não seminoma	49 (71,0)	3 (100,0)	
Histologia em categorias	Seminoma	20 (29,0)	0 (0,0)	0,262
	Carcinoma embrionário	9 (13,0)	1 (33,3)	
	Teratoma maduro	1 (1,4)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	3 (4,3)	0 (0,0)	
	Seio endodérmico	4 (5,8)	1 (33,3)	
	TCG misto	32 (46,4)	1 (33,3)	
Estadiamento	I	10 (14,5)	0 (0,0)	0,999
	IS / II / III	59 (85,5)	3 (100,0)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5 (8,8)	0 (0,0)	0,086
	S1	28 (49,1)	0 (0,0)	
	S2	21 (36,8)	2 (66,7)	
	S3	3 (5,3)	1 (33,3)	
Metástase ao diagnóstico	Não	21 (30,4)	0 (0,0)	0,551
	Sim	48 (69,6)	3 (100,0)	
Número de sítios de metástase	0	21 (30,4)	0 (0,0)	0,007*
	1	33 (47,8)	1 (33,3)	
	2	13 (18,8)	0 (0,0)	
	3	2 (2,9)	2 (66,7)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	40 (71,4)	0 (0,0)	0,030*
	Intermediário	11 (19,6)	2 (66,7)	
	Alto	5 (8,9)	1 (33,3)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	46 (78,0)	1 (33,3)	0,143
	Refratários	13 (22,0)	2 (66,7)	

*p-valor <0,05

Tabela 17 - Regressão logística múltipla para o gene *ADAMTS1*.

Variável	Categoria	Exp(B)	IC 95%		p-valor
			LI	LS	
Quimiossensibilidade	Sensível	1	--	--	0,122
	Refratário	7,077	0,594	84,351	
Constante		0,022	--	--	0,001

5.5.4 Gene *CALCA*

Para o gene *CALCA*, foi encontrada uma associação significativa em relação à classificação histológica sendo que 90,5% dos casos metilados pertenciam ao grupo dos não seminomas em comparação com 64,7% dos não metilados. Uma associação significativa também foi observada em relação a histologia. Neste caso, podemos notar que 23,8% dos casos metilados foram diagnosticados como carcinoma embrionário frente a 9,8% dos casos não metilados e, também, que 19% dos metilados apresentaram o diagnóstico de seio endodérmico comparado a 2,0% dos casos não metilados. Ainda uma associação significativa foi encontrada em relação à quimiossensibilidade, na qual podemos observar que dos pacientes refratários ao tratamento 42,9% são metilados em relação a 11,6% dos não metilados, enquanto que para os sensíveis ao tratamento 86% dos casos são não metilados frente a 52,5% de casos metilados (Tabela 18).

A análise de regressão logística múltipla para o gene *CALCA* revelou uma associação significativa com as variáveis classificação histológica e quimiossensibilidade. Podemos observar que pacientes acometidos por não seminomas e refratários ao tratamento, respectivamente, tem um chance 9,94 vezes e 4,64 vezes maior de apresentar o *CALCA* metilado (Tabela 19).

Tabela 18 - Associação do perfil de metilação do gene *CALCA* com características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		CALCA		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	28 (54,9)	14 (66,7)	0,357
	≥29,6	23 (45,1)	7 (33,3)	
Classificação histológica	Seminoma	18 (35,3)	2 (9,5)	0,026*
	Não seminoma	33 (64,7)	19 (90,5)	
Histologia em categorias	Seminoma	18 (35,3)	2 (9,5)	0,017*
	Carcinoma embrionário	5 (9,8)	5 (23,8)	
	Teratoma maduro	1 (2,0)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	2 (3,9)	1 (4,8)	
	Seio endodérmico	1 (2,0)	4 (19,0)	
	TCG misto	24 (47,1)	9 (42,9)	
Estadiamento	I	9 (17,6)	1 (4,8)	0,151
	IS / II / III	42 (82,4)	20 (95,2)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5 (11,6)	0 (0,0)	0,399
	S1	20 (46,5)	8 (47,1)	
	S2	16 (37,2)	7 (41,2)	
	S3	2 (4,7)	2 (11,8)	
Metástase ao diagnóstico	Não	17 (33,3)	4 (19,0)	0,225
	Sim	34 (66,7)	17 (81,0)	
Número de sítios de metástase	0	17 (33,3)	4 (19,0)	0,124
	1	25 (49,0)	9 (42,9)	
	2	8 (15,7)	5 (23,8)	
	3	1 (2,0)	3 (14,3)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	32 (76,2)	8 (47,1)	0,057
	Intermediário	7 (16,7)	6 (35,3)	
	Alto	3 (7,1)	3 (17,6)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	37 (86,0)	10 (52,6)	0,005*
	Refratários	6 (14,0)	9 (47,4)	

*p-valor <0,05

Tabela 19 - Regressão logística múltipla para o gene *CALCA*.

Variável	Categoria	Exp(B)	IC 95%		p-valor
			LI	LS	
Tipo histológico	Seminoma	1	--	--	0,036
	Não seminoma	9,936	1,163	84,864	
Quimiossensibilidade	Sensível	1	--	--	0,023
	Refratário	4,639	1,236	17,409	
Constante		0,043	--	--	0,003

5.5.5 Gene *HOXA9*

Para o gene *HOXA9*, dos tumores classificados como metilados, 85,7% pertenciam a faixa etária menor que 29,6 anos ($p<0,05$), e 100% ao grupo dos não seminomas ($p<0,05$). Uma associação significativa também foi encontrada quanto a histologia com 34,5% dos tumores não metilados associados ao seminoma, e 64,3% dos metilados com tumores mistos (Tabela 20). Ainda em relação a histologia, podemos observar que 21,4% dos casos metilados eram de carcinoma embrionário em comparação a 12,1% dos não metilados e, 14,3% dos casos metilados de seio endodérmico frente a 5,2% dos não metilados.

A análise de regressão logística múltipla para este gene revelou uma associação com a idade. No caso, pacientes com idade superior ou igual a 29,6 anos tem uma chance 5,6 vezes maior de apresentar o *HOXA9* não metilado em relação aos pacientes com idade inferior a 29,6 anos (Tabela 21).

Tabela 20 - Associação do perfil de metilação do gene *HOXA9* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		<i>HOXA9</i>		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	30 (51,7)	12 (85,7)	0,021*
	≥29,6	28 (48,3)	2 (14,3)	
Classificação histológica	Seminoma	20 (34,5)	0 (0,0)	0,010*
	Não seminoma	38 (65,5)	14 (100,0)	
Histologia em categorias	Seminoma	20 (34,5)	0 (0,0)	0,034*
	Carcinoma embrionário	7 (12,1)	3 (21,4)	
	Teratoma maduro	1 (1,7)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	3 (5,2)	0 (0,0)	
	Seio endodérmico	3 (5,2)	2 (14,3)	
	TCG misto	24 (41,4)	9 (64,3)	
Estadiamento	I	8 (13,8)	2 (14,3)	0,999
	IS / II / III	50 (86,2)	12 (85,7)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5 (10,6)	0 (0,0)	0,358
	S1	22 (46,8)	6 (46,2)	
	S2	18 (38,3)	5 (38,5)	
	S3	2 (4,3)	2 (15,4)	
Metástase ao diagnóstico	Não	17 (29,3)	4 (28,6)	0,999
	Sim	41 (70,7)	10 (71,4)	
Número de sítios de metástase	0	17 (29,3)	4 (28,6)	0,438
	1	28 (48,3)	6 (42,9)	
	2	11 (19,0)	2 (14,3)	
	3	2 (3,4)	2 (14,3)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	34 (72,3)	6 (50,0)	0,122
	Intermediário	10 (21,3)	3 (25,0)	
	Alto	3 (6,4)	3 (25,0)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	38 (76,0)	9 (75,0)	0,942
	Refratários	12 (24,0)	3 (25,0)	

*p-valor <0,05

Tabela 21- Regressão logística para o gene *HOXA9*.

Variável	Categoria	Exp(B)	IC 95%		p-valor
			LI	LS	
Idade - média	<29,6	1	--	--	0,033
	≥29,6	0,179	0,037	0,870	
Constante		0,400	--	--	0,007

5.5.6 Gene *CDKN2B*

Para o gene *CDKN2B*, nenhuma associação significativa foi encontrada em relação às variáveis avaliadas e o padrão de metilação do gene (Tabela 22).

Tabela 22 - Associação do estado de metilação do gene *CDKN2B* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		<i>CDKN2B</i>		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	22 (62,9)	20 (54,1)	0,449
	≥29,6	13 (37,1)	17 (45,9)	
Classificação histológica	Seminoma	8 (22,9)	12 (32,4)	0,365
	Não seminoma	27 (77,1)	25 (67,6)	
Histologia em categorias	Seminoma	8 (22,9)	12 (32,4)	0,372
	Carcinoma embrionário	3 (8,6)	7 (18,9)	
	Teratoma maduro	1 (2,9)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	2 (5,7)	1 (2,7)	
	Seio endodérmico	4 (11,4)	1 (2,7)	
	TCG misto	17 (48,6)	16 (43,2)	
Estadiamento	I	4 (11,4)	6 (16,2)	0,557
	IS / II / III	31 (88,6)	31 (83,8)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	2 (6,7)	3 (10,0)	0,999
	S1	14 (46,7)	14 (46,7)	
	S2	12 (40,0)	11 (36,7)	
	S3	2 (6,7)	2 (6,7)	
Metástase ao diagnóstico	Não	10 (28,6)	11 (29,7)	0,914
	Sim	25 (71,4)	26 (70,3)	
Número de sítios de metástase	0	10 (28,6)	11 (29,7)	0,130
	1	13 (37,1)	21 (56,8)	
	2	10 (28,6)	3 (8,1)	
	3	2 (5,7)	2 (5,4)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	18 (62,1)	22 (73,3)	0,612
	Intermediário	7 (24,1)	6 (20,0)	
	Alto	4 (13,8)	2 (6,7)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	21 (72,4)	26 (78,8)	0,559
	Refratários	8 (27,6)	7 (21,2)	

5.5.7 Gene *CDO1*

Para o gene *CDO1*, uma associação significativa foi encontrada em relação ao número de sítios metastáticos ao diagnóstico. Podemos observar que dos pacientes metilados 100% apresentavam pelo menos um sítio metastático ao diagnóstico quando comparado a 69,1% dos não metilados. Uma associação significativa também foi observada para a classificação de risco (IGCCCG), para a qual 100% dos pacientes metilados foram classificados com risco intermédio ou alto risco, enquanto apenas 27,3% dos não metilados foram classificados nestes mesmas categorias. Em relação à quimiossensibilidade, 75% dos pacientes metilados são refratários comparado a 17,6% dos não metilados (Tabela 23).

Embora não significativo, podemos chamar atenção para os casos com tumores metilados, dos quais 100% pertenciam ao grupo dos não seminomas, tinham idade abaixo de 29,6 anos e apresentavam estadiamento avançado.

A análise de regressão logística múltipla realizada para o gene *CDO1* demonstrou uma associação significativa com quimiossensibilidade, sendo que os pacientes refratários ao tratamento apresentam 11,5 vezes maior chance de apresentar o gene *CDO1* metilado (Tabela 24).

Tabela 23 - Associação do perfil de metilação do gene *CDO1* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		<i>CDO1</i>		p-valor
		Não metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	38 (55,9)	4 (100,0)	0,135
	≥29,6	30 (44,1)	0 (0,0)	
Classificação histológica	Seminoma	20 (29,4)	0 (0,0)	0,570
	Não seminoma	48 (70,6)	4 (100,0)	
Histologia em categorias	Seminoma	20 (29,4)	0 (0,0)	0,087
	Carcinoma embrionário	10 (14,7)	0 (0,0)	
	Teratoma maduro	1 (1,5)	0 (0,0)	
	Teratoma imaturo	3 (4,4)	0 (0,0)	
	Seio endodérmico	3 (4,4)	2 (50,0)	
	TCG misto	31 (45,6)	2 (50,0)	
Estadiamento	I	10 (14,7)	0 (0,0)	0,999
	IS / II / III	58 (85,3)	4 (100,0)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5 (8,6)	0 (0,0)	0,072
	S1	28 (48,3)	0 (0,0)	
	S2	22 (37,9)	1 (50,0)	
	S3	3 (5,2)	1 (50,0)	
Metástase ao diagnóstico	Não	21 (30,9)	0 (0,0)	0,315
	Sim	47 (69,1)	4 (100,0)	
Número de sítios de metástase	0	21 (30,9)	0 (0,0)	0,011*
	1	32 (47,1)	2 (50,0)	
	2	13 (19,1)	0 (0,0)	
	3	2 (2,9)	2 (50,0)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	40 (72,7)	0 (0,0)	0,001*
	Intermediário	10 (18,2)	3 (75,0)	
	Alto	5 (9,1)	1 (25,0)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	46 (79,3)	1 (25,0)	0,041*
	Refratários	12 (20,7)	3 (75,0)	

*p-valor <0,05

Tabela 24 - Regressão logística múltipla para o gene *CDO1*.

Variável	Categoria	Exp(B)	IC 95%		p-valor
			LI	LS	
Quimiossensibilidade	Sensível	1	--	--	0,042
	Refratário	11,500	1,096	120,663	
Constante		0,022	--	--	0,001

5.5.8 Gene *NANOG*

Para o gene *NANOG*, nenhuma associação significativa foi encontrada em relação às variáveis avaliadas e o padrão de metilação do gene (Tabela 25).

Na análise de regressão logística múltipla, não observamos nenhum resultado estatisticamente significativo para as variáveis avaliadas.

Tabela 25 - Associação do estado de metilação do gene *NANOG* com as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Características clínicas		<i>NANOG</i>		p-valor
		Não Metilado N(%)	Metilado N(%)	
Idade	<29,6	18(47,4)	18(69,2)	0,083
	≥29,6	20(52,6)	8(30,8)	
Classificação histológica	Seminoma	13(34,2)	6(23,1)	0,338
	Não seminoma	25(65,8)	20(76,9)	
Histologia em categorias	Seminoma	13(34,2)	6(23,1)	0,259
	Carcinoma embrionário	7(18,4)	3(11,5)	
	Teratoma maduro	1(2,6)	0(0,0)	
	Teratoma imaturo	0(0,0)	3(11,5)	
	Seio endodérmico	2(5,3)	1(3,8)	
	TCG misto	15(39,5)	13(50,0)	
Estadiamento	I	4(10,5)	5(19,2)	0,325
	IS / II / III	34(89,5)	21(80,8)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	3(10,3)	1(4,3)	0,249
	S1	10(34,5)	14(60,9)	
	S2	15(51,7)	7(30,4)	
	S3	1(2,6)	1(4,3)	
Metástase ao diagnóstico	Não	9(23,7)	9(34,6)	0,339
	Sim	29(76,3)	17(65,4)	
Número de sítios de metástase	0	9(23,7)	9(34,6)	0,093
	1	23(60,5)	8(30,8)	
	2	5(13,2)	7(26,9)	
	3	1(2,6)	2(7,7)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	23(71,9)	12(60,0)	0,604
	Intermediário	7(21,9)	5(25,0)	
	Alto	2(6,3)	3(15,0)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	26(78,8)	16(72,7)	0,449
	Refratários	7(21,2)	6(27,3)	

Diante de todos os resultados dos genes em relação as características clínicas, uma análise foi realizada considerando o número de genes metilados independente do gene. Baseado em nossos dados, para determinar o melhor ponto de corte para estabelecer o número de genes metilados que fossem capaz de discriminar com a maior sensibilidade e especificidade os pacientes com os diferentes desfechos clínicos considerados, nós realizamos uma análise de curva ROC (Tabela 26).

Tabela 26 - Análise da curva ROC para o número de genes metilados.

Variável	Área abaixo da curva	Desvio Padrão	p-valor	IC 95%	
				Limite inferior	Limite superior
Número de genes metilados	0,604	0,08	0,173	0,448	0,76

Esta análise demonstrou que o número de dois genes metilados como ponto de corte foi o que apresentou melhor sensibilidade (60%) e especificidade (48,1%), entre todos os pontos de corte. Assim, os pacientes foram divididos em dois grupos, o primeiro cujo tumor apresentava dois ou menos genes metilados, e o segundo cujo tumor apresentava mais de 2 genes metilados. A partir desta análise, esse dois grupos foram submetidos a associação com as variáveis clínicas e patológicas dos pacientes.

Os resultados obtidos nesta análise demonstraram uma associação significativa para a classificação histológica, sendo que os não seminomas apresentaram predominantemente mais de dois genes metilados (94,7%), e os seminomas apresentaram menor número de genes metilados.

Uma associação significativa foi encontrada para os tumores classificados em histologia, sendo que dentro do grupo dos não seminomas, os tumores de seio endodérmico apresentaram mais genes metilados, correspondendo a 15,8% dos tumores (Tabela 27).

Apesar de não significativo, podemos destacar que aparentemente os pacientes que apresentaram tumores com um maior número de genes metilados foram refratários ao tratamento (43,8%) em relação aos não metilados (18,2%).

Tabela 27 - Associação do número de genes metilados com as características clínicas.

Características clínicas		Número de genes metilados		p-valor
		≤ 2 N(%)	>2 N(%)	
Idade	<29,6	29(54,7)	13(68,4)	0,299
	≥29,6	24(45,3)	6(31,6)	
Classificação histológica	Seminoma	19(35,8)	1(5,3)	0,011*
	Não seminoma	34(64,2)	18(94,7)	
Histologia em categorias	Seminoma	19(35,8)	1(5,3)	0,041*
	Carcinoma embrionário	6(11,3)	4(21,1)	
	Teratoma maduro	1(1,9)	0(0,0)	
	Teratoma imaturo	2(3,8)	1(5,3)	
	Seio endodérmico	2(3,8)	3(15,8)	
	TCG misto	23(43,4)	10(52,6)	
Estadiamento	I	8(15,1)	2(10,5)	0,621
	IS / II / III	45(84,9)	17(89,5)	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5(11,4)	0(0,0)	0,397
	S1	21(47,7)	7(43,8)	
	S2	16(36,4)	7(43,8)	
	S3	2(4,5)	2(12,5)	
Metástase ao diagnóstico	Não	16(30,2)	5(26,3)	0,750
	Sim	37(69,8)	14(73,7)	
Risco de tratamento (IGCCCG)	Baixo	32(74,4)	8(50,0)	0,176
	Intermediário	8(18,6)	5(31,3)	
	Alto	3(7,0)	3(18,8)	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	36(81,8)	11(61,1)	0,084
	Refratários	8(18,2)	7(38,9)	

*p-valor<0,05

5.6 Análise de sobrevida global (SG) em relação as características clínicas, patológicas e perfil de metilação dos genes

A sobrevida global foi determinada em relação a comparação das variáveis clínicas e moleculares, considerando como evento o óbito por qualquer causa, sendo o tempo de acompanhamento a data de diagnóstico até a data do óbito.

As estimativas de sobrevida global foram determinada sem 1, 3 e 5 anos (Tabela 28). Podemos observar que o número de marcadores séricos elevados ao diagnóstico tem um impacto significativo na sobrevida global. Pacientes que apresentaram elevação dos marcadores séricos em S2 ou S3 ao diagnóstico obtiveram estimativas de sobrevida global de 76,3% em cinco anos e 50% em três anos, respectivamente, enquanto os pacientes sem elevação de qualquer marcador sérico estavam todos vivos em cinco anos. Uma associação significativa também foi encontrada em relação à quimiossensibilidade, pois os casos

refratários ao tratamento apresentaram uma estimativa de sobrevida global de 68,5% em relação a uma sobrevida de 93,1% para os casos sensíveis, em cinco anos (Figura 7).

Podemos destacar em relação à histologia, com um p valor próximo ao estatisticamente significativo, que os tumores de seio endodérmico apresentaram a pior sobrevida em cinco anos em relação às outras histologias (60%). Podemos destacar também que ter metástase ao diagnóstico, mesmo que não significativo, está associado a menores estimativas de sobrevida global em cinco anos. Quando essa observação é direcionada para o número de sítios metastáticos, podemos observar que metástases em dois ou mais sítios apresentam pior estimativa de sobrevida global (66,7%) comparado a pacientes não metastáticos (100%), em cinco anos.

Em relação a metilação dos genes, podemos enfatizar que a metilação de *CDKN2B* está associada a melhores estimativas de sobrevida global (91,4%) quando comparados aos pacientes não metilados (73,4%), em cinco anos; a metilação do gene *CDO1* está associada a menor sobrevida global (37,5%), quando comparados aos pacientes não metilados (85,9%), em cinco anos. Apesar dessa observação, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

A partir destes dados foi realizada uma regressão de Cox múltipla considerando as variáveis com $p < 0,2$ na análise univariada. Podemos observar uma associação estatisticamente significativa para a idade, sendo que casos com idade maior de 29,6 anos apresentam 12 vezes maior chance de vir a óbito que pacientes com menor idade. Uma associação significativa também foi encontrada para a classificação de risco segundo IGCCCG, sendo que pacientes com risco intermediário apresentam 14 vezes mais chance de vir a óbito, e pacientes com risco alto, 148 vezes maior chance (Tabela 29).

Tabela 28 - Estimativas de sobrevida global em 1, 3 e 5 anos em relação a variáveis clínicas e moleculares dos pacientes.

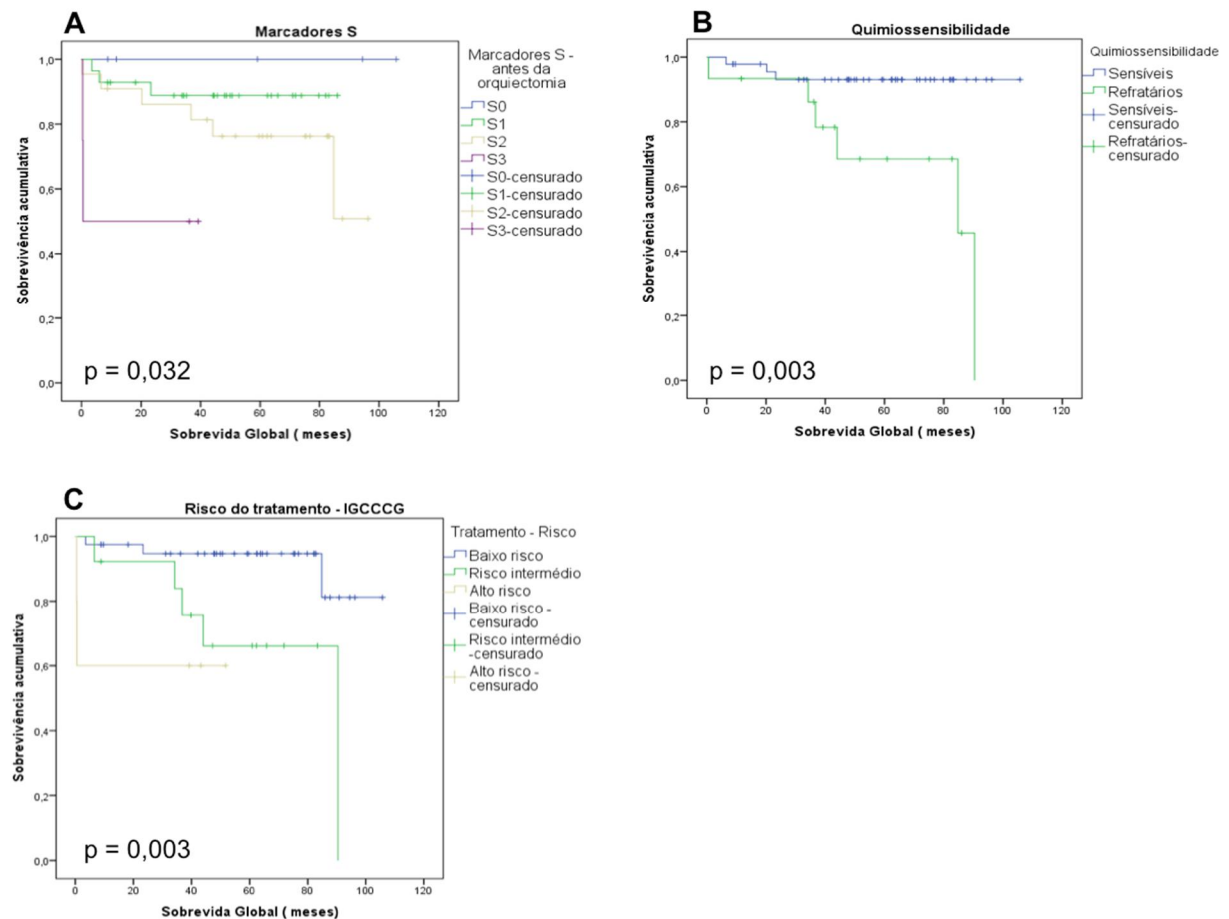
Variáveis	Categorias	Casos (n)	Eventos(n)	Probabilidade de sobrevida (%)			p-valor
				1 ano	3 anos	5 anos	
Idade	<29,6	41	5	95,1	95,1	86,4	0,129
	≥29,6	30	8	86,7	82,9	78,3	
Classificação histológica	Seminoma	20	4	85,0	85,0	78,5	0,532
	Não seminoma	51	9	94,1	87,7	85,1	
Histologia	Seminoma	20	4	85,0	85,0	78,5	0,061
	Carcinoma embrionário	10	0	100,0	100,0	100,0	
	Teratoma maduro	1	0	100,0	100,0	100,0	
	Teratoma imaturo	3	1	100,0	66,7	--	
	Seio endodérmico	5	3	100,0	80,0	60,0	
	TCG Misto	32	5	90,6	90,6	90,6	
Estadiamento	I	10	0	100,0	100,0	100,0	0,129
	IS / II / III	61	13	90,2	84,6	80,5	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5	0	100,0	100,0	100,0	0,032*
	S1	28	3	92,9	88,8	88,8	
	S2	22	6	90,9	86,1	76,3	
	S3	4	2	50,0	50,0	--	
Metástase ao diagnóstico	Não	21	1	100,0	100,0	100,0	0,061
	Sim	50	12	88,0	81,4	76,6	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	46	3	97,8	93,1	93,1	0,003*
	Refratários	15	6	93,3	93,3	68,5	
Risco do tratamento (IGCCCG)	Baixo	40	3	97,5	94,7	94,7	0,003*
	Intermediário	13	5	92,3	83,9	66,1	
	Alto	5	2	80,0	60,0	--	
Número de sítios de metástase	0	21	1	100,0	100,0	100,0	0,076
	1	34	6	91,2	84,4	80,9	
	2	12	5	75,0	66,7	66,7	
	3	4	1	100,0	100,0	66,7	
VGF	Não metilado	61	10	91,8	88,1	86,1	0,224
	Metilado	10	3	90,0	78,8	63,0	
MGMT	Não metilado	50	7	88,0	85,6	85,6	0,386
	Metilado	21	6	100,0	90,0	77,9	
ADAMTS1	Não metilado	68	12	91,2	86,2	84,4	0,504
	Metilado	3	1	100,0	100,0	50,0	
CALCA	Não metilado	50	7	90,0	87,8	87,8	0,192
	Metilado	21	6	95,2	85,2	73,7	
HOXA9	Não metilado	58	10	91,4	87,6	85,4	0,470
	Metilado	13	3	92,3	83,9	74,6	
CDKN2B	Não metilado	34	9	88,2	81,7	73,4	0,088
	Metilado	37	4	94,6	91,4	91,4	
CDO1	Não metilado	67	11	91,0	87,7	85,9	0,092
	Metilado	4	2	100,0	75,0	37,5	
NANOG	Não metilado	37	6	91,9	88,5	84,9	0,787
	Metilado	26	5	92,3	83,9	83,9	
Número de genes metilados	≤2	52	9	88,5	86,3	83,8	0,914
	>2	19	4	100,0	88,9	82,1	

*p-valor <0,05

Tabela29 - Regressão de Cox múltipla para a sobrevida global.

Variável	Categoria	Exp(B)	I.C 95%		p-valor
			LI	LS	
Idade média	<29,6	1	—	—	0,027*
	≥29,6	12,01	1,32	108,95	
CALCA	Não metilado	1,00	—	—	0,207
	Metilado	0,30	0,05	1,95	
CDKN2B	Não metilado	1,00	—	—	0,054
	Metilado	0,19	0,04	1,03	
CDO1	Não metilado	1,00	—	—	0,058
	Metilado	9,01	0,93	87,64	
Risco do tratamento	Baixo	—	—	—	0,011
	Intermediário	14,09	1,89	105,05	
	Alto	148,48	5,23	4210,27	

*p-valor <0,05

**Figura 7.** Análise de sobrevida global de acordo com as características clínicas dos pacientes. Curvas de Kaplan Meier para (A) Marcadores séricos, (B) Quimiossensibilidade e (C) Risco do tratamento.

5.7 Análise de sobrevida livre de eventos (SLE) em relação as características clínicas, patológicas e perfil de metilação dos genes.

A sobrevida livre de eventos foi avaliada considerando as variáveis clínicas e moleculares (metilação dos genes), e foram considerados eventos: progressão, recidiva ou óbito considerando a data do diagnóstico e a data evento que ocorreu primeiro.

Em relação as características clínicas, nossos dados revelaram um impacto significativo nas estimativas de sobrevida livre de eventos associados a histologia, número de marcadores séricos elevados ao diagnóstico, metástase ao diagnóstico, quimiossensibilidade, classificação de risco e número de sítios metastáticos ao diagnóstico. Em relação a metilação dos genes, podemos observar um impacto significativo nas estimativas de sobrevida livre de eventos associados a metilação de *MGMT* e metilação de *CALCA* (Figura 8; Tabela 30).

Em relação a histologia, tumores de seio endodérmico apresentaram a menor sobrevida (20%) quando comparados aos demais subtipos, em cinco anos. O maior número de marcadores séricos elevado (S3) apresentou a menor estimativa de SLE com 25% em um ano. Todos os pacientes deste grupo apresentaram ocorrência de evento antes de três anos. Ainda, pacientes apresentando dois marcadores elevados (S2) tiveram estimativas de SLE de 51,5%, enquanto pacientes sem elevação de marcadores apresentaram estimativa de SLE de 100%, em cinco anos. Um valor estatisticamente significativo também foi encontrado para metástase ao diagnóstico, e isso está relacionado a menores estimativas de SLE (58,9%) quando comparados aos pacientes não metastáticos ao diagnóstico (95,6%), em cinco anos. A respeito da ocorrência de metástases em números de sítios, em 2 ou mais sítios de metástase as estimativas da SLE foram as mais baixa (16,7 e 25%, respectivamente) em relação aos pacientes não metastáticos (95,2%), em cinco anos. Por último, considerando a quimiossensibilidade, uma associação significativa foi encontrada e os casos refratários representaram a pior estimativa de SLE(7,5%) em relação aos casos sensíveis (93,1%), em cinco anos.

Quanto a metilação dos genes, pacientes metilados para o gene *MGMT* apresentaram SLE de 50,5%, comparado a 77,1% dos não metilados, em cinco anos. Pacientes com metilação de *CALCA* também apresentaram menor SLE de 51,3%, frente a 77,0% dos não metilados, em cinco anos. Embora não significativo, podemos destacar também que

pacientes metilados para os genes *VGF*, *ADAMTS1* e *CDO1* apresentaram menores estimativas de SLE, em relação aos não metilados, em cinco anos (Tabela 30).

Da mesma forma que para a SG, para a SLE foi realizada uma regressão de Cox múltipla considerando as variáveis com $p < 0,2$ na análise univariada. Podemos observar uma associação estatisticamente significativa para o risco IGCCCG. Pacientes classificados no risco intermediário apresentaram 3,5 vezes maior chance de ocorrência de evento, sendo essa chance de 21,54 vezes maior nos pacientes de alto risco (Tabela 31).

Tabela 30 - Estimativas de sobrevida livre de eventos em 1, 3 e 5 anos em relação a variáveis clínicas e moleculares dos pacientes.

Variáveis	Categorias	Casos (n)	Eventos (n)	Probabilidade de sobrevida (%)			p-valor
				1 ano	3 anos	5 anos	
Idade	<29,6	41	10	92,7	82,2	71,6	0,275
	≥29,6	30	10	73,3	65,6	65,6	
Classificação histológica	Seminoma	20	4	85,0	78,9	78,9	0,436
	Não seminoma	51	16	84,3	73,9	65,1	
Histologia	Seminoma	20	4	85,0	78,9	78,9	0,039*
	Carcinoma embrionário	10	1	100,0	100,0	85,7	
	Teratoma maduro	1	0	100,0	100,0	100,0	
	Teratoma imaturo	3	2	66,7	33,3	--	
	Seio Endodérmico	5	4	80,0	40,0	20,0	
	TCG Misto	32	9	81,3	74,3	69,0	
Estadiamento	I	10	0	100,0	100,0	100,0	0,056
	IS / II / III	61	20	82,0	71,1	64,2	
Marcadores S antes da orquiectomia	S0	5	0	100,0	100,0	100,0	0,010*
	S1	28	3	92,9	88,8	88,8	
	S2	22	10	77,3	67,6	51,5	
	S3	4	4	25,0	--	--	
Metástase ao diagnóstico	Não	21	1	95,2	95,2	95,2	0,009*
	Sim	50	19	80,0	67,0	58,9	
Quimiossensibilidade	Sensíveis	46	3	97,8	93,1	93,1	0,001*
	Refratários	15	13	60,0	30,0	7,5	
Risco do tratamento (IGCCCG)	Baixo	40	6	90,0	87,2	84,0	0,001*
	Intermediário	13	6	84,6	58,0	46,4	
	Alto	5	5	40,0	20,0	--	
Número de sítios de metástase	0	21	1	95,2	95,2	95,2	0,010*
	1	34	6	91,2	81,4	81,4	
	2	12	9	50,0	33,3	16,7	
	3	4	4	75,0	50,0	25,0	
VGF	Não metilado	61	15	85,2	78,0	72,6	0,091
	Metilado	10	5	80,0	58,3	46,7	
MGMT	Não metilado	50	10	86,0	83,7	77,1	0,032*
	Metilado	21	10	81,0	56,1	50,5	
ADAMTS1	Não metilado	68	18	83,8	75,7	70,8	0,211
	Metilado	3	2	100,0	66,7	33,3	
CALCA	Não metilado	50	10	86,0	83,7	77,0	0,029*
	Metilado	21	10	81,0	56,4	51,3	
HOXA9	Não metilado	58	16	82,8	75,1	69,3	0,909
	Metilado	13	4	92,3	76,9	68,4	
CDKN2B	Não metilado	34	13	82,4	69,2	55,0	0,086
	Metilado	37	7	86,5	80,7	80,7	
CDO1	Não metilado	67	17	83,6	76,9	72,0	0,059
	Metilado	4	3	100,0	50,0	25,0	
NANOG	Não metilado	37	8	86,5	80,3	76,1	0,325
	Metilado	26	9	67,9	60,3	60,3	
Número de genes metilados	≤2	52	12	84,6	80,3	73,8	0,172
	>2	19	8	84,2	62,3	56,7	

*p-valor <0,05

Tabela 31 - Regressão de Cox para Sobrevida Livre de eventos.

Variável	Categoria	Exp(B)	I.C 95%		p-valor
			L.I	L.S	
Risco do tratamento (IGCCCG)	Baixo				0,001
	Intermediário	3,50	1,13	10,89	0,030
	Alto	21,54	5,96	77,85	0,001

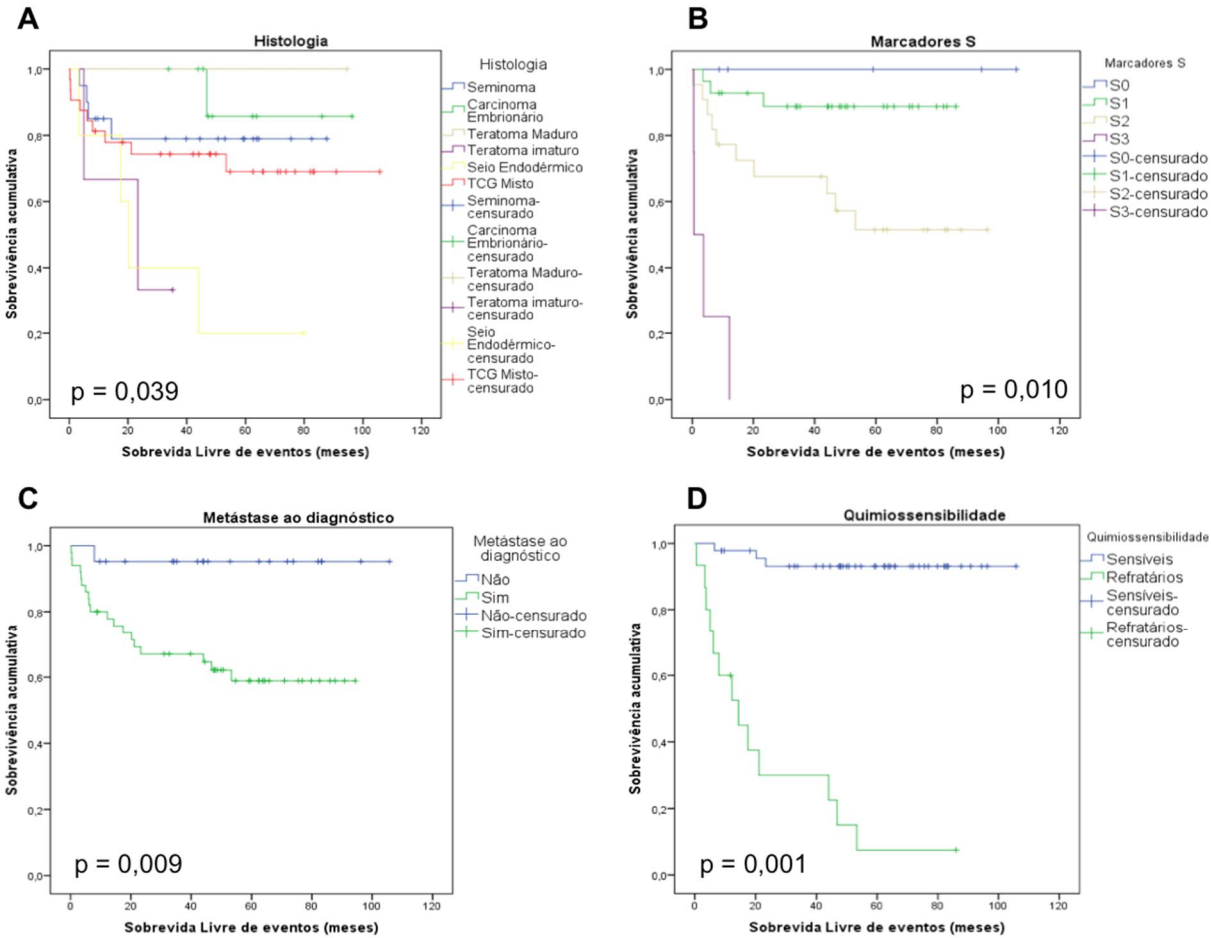


Figura 8. Análise de sobrevida livre de eventos de acordo com as características clínicas dos pacientes e perfil de metilação dos genes. Curvas de Kaplan Meier para (A) Histologia, (B) Marcadores séricos, (C) Metástase ao diagnóstico, (D) Quimiossensibilidade, (E) Risco do tratamento, (F) Número de sítios de metástase, (G) Metilação de *MGMT*, (H) Metilação de *CALCA*.

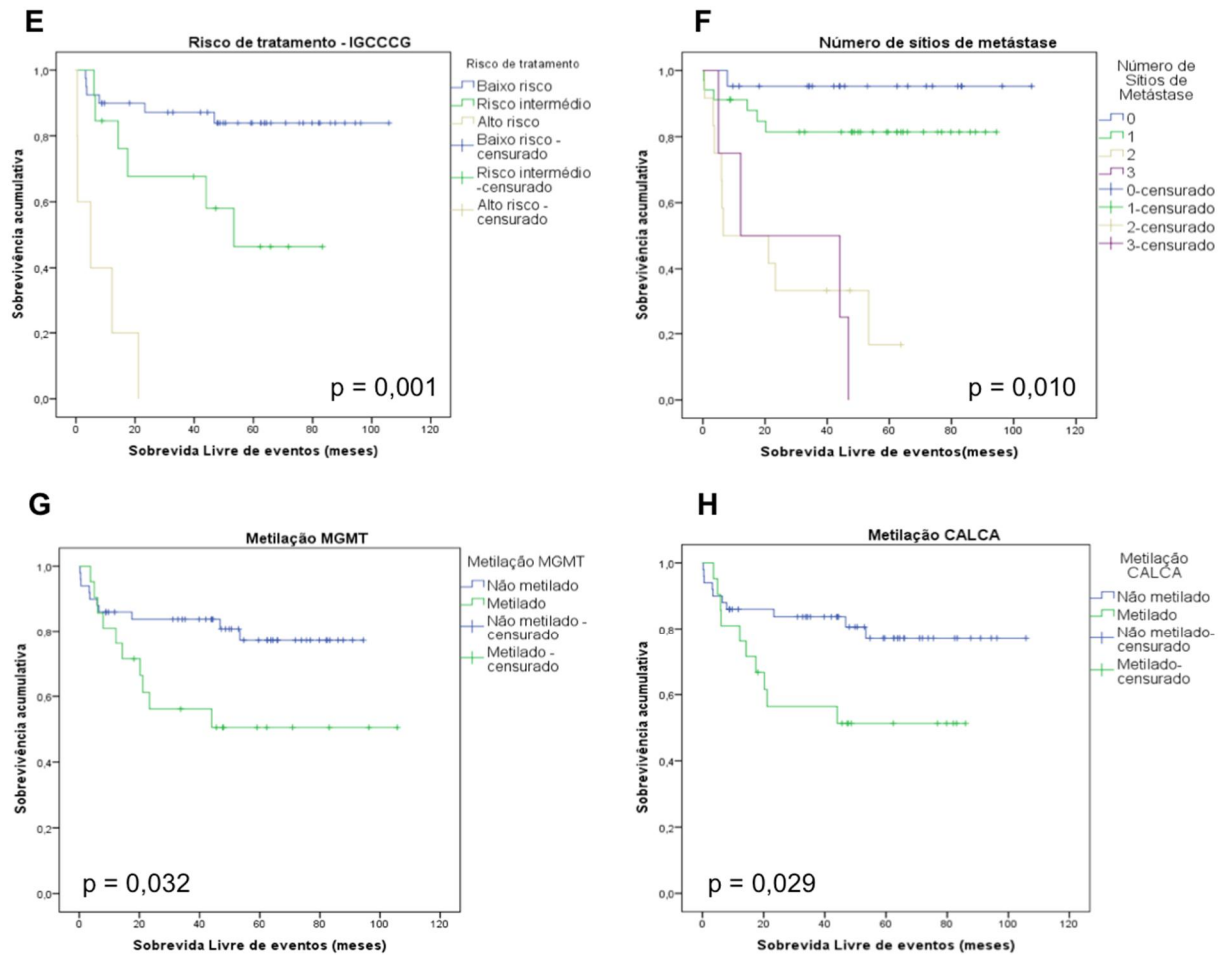


Figura 8 (Continuação). Análise de sobrevida livre de eventos de acordo com as características clínicas dos pacientes e perfil de metilação dos genes. Curvas de Kaplan Meier para (A) Histologia, (B) Marcadores séricos, (C) Metástase ao diagnóstico, (D) Quimiossensibilidade, (E) Risco do tratamento, (F) Número de sítios de metástase, (G) Metilação de *MGMT*, (H) Metilação de *CALCA*.

6 DISCUSSÃO

A metilação do DNA é uma modificação epigenética envolvida na regulação de processos celulares normais, porém, existem cada vez mais evidências da sua frequência e importância no processo da carcinogênese⁷⁴. O tumor de células germinativas de testículo se origina de células germinativas primordiais em um momento de grande reprogramação epigenética, que apesar de ser um pré-requisito para o desenvolvimento fetal normal, é considerada um evento crucial na etiologia do câncer⁷⁵.

Sobre esses tumores, sua capacidade de se transformarem em qualquer tipo de tecido somático revela que mudanças epigenéticas ocorrem durante o seu desenvolvimento, afetando a expressão gênica. Embora as alterações epigenéticas nesses tumores não estejam completamente descritas, há evidências de que exista um perfil de metilação distinto para os dois grupos, seminomas e não seminomas, possivelmente explicando como esses dois tipos tumorais se desenvolvem a partir de uma mesma célula de origem⁷⁶.

No presente estudo nós avaliamos o perfil de metilação dos genes *VGF*, *MGMT*, *CALCA*, *CDKN2B*, *CDO1*, *HOXA9*, *ADAMTS1* e *NANOG* nos tumores de células germinativas de testículo através do método de PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP). O desenvolvimento da QMSP simplificou o estudo dos genes inativados pela metilação dos promotores, pois possui a vantagem de aumentar a especificidade e a sensibilidade, atribuído ao uso de iniciadores específicos desenhados para a amplificação somente de áreas metiladas e ao uso de uma sonda específica para cada gene, quando comparado a PCR convencional. Portanto, esse método foi escolhido por apresentar uma alta sensibilidade para a detecção da metilação aberrante nos promotores dos genes estudados, e por ser um ensaio quantitativo, permitiu analisar de maneira objetiva os níveis de metilação nas regiões estudadas. Foi demonstrado que os ensaios por metilação específica podem constantemente detectar 0,1% de DNA metilado, porém essa alta sensibilidade do método é acompanhada do risco de avaliar pequenos níveis de metilação que não tem significância, sendo esta a desvantagem do método, ou ainda a amplificação de DNA não convertido⁷⁷.

Apesar de raros, os tumores de células germinativas de testículo são os tumores sólidos mais comuns em homens com idade entre 18 e 35 anos, representando a principal causa de morte neste grupo⁷⁸. A casuística estudada compreendeu homens com uma idade

média de 29,6 anos, com 58,3% dos casos envolvendo homens com idade menor que 29,6. Trabalhos na literatura que avaliaram TCGTs também demonstraram que a média de idade destes pacientes variou de 18 a 35 anos^{60, 79, 80}.

A classificação histológica tradicional dos TCGTs divide-os em dois grupos principais: seminomas e não seminomas, sendo estes predominantes no estudo com 72,2% das amostras. O grupo dos não seminomas compreendem histologias mais diferenciadas e são mais agressivos e menos sensíveis ao tratamento. Dos casos estudados, 75,8% dos tumores (seminomas e não seminomas) se apresentaram sensíveis ao tratamento, o que vai de acordo com a literatura, pois a introdução da cisplatina em 1970 fez dos TCGTs um modelo de sensibilidade. É um dos tipos de neoplasia mais curáveis com aproximadamente 96% de sobrevida em 5 anos contra 83% de sobrevida na década de 70⁸¹. No presente estudo, a sobrevida global dos casos tumorais compreendeu 93,1% em 5 anos.

O estadiamento da doença é baseado na extensão da doença ao diagnóstico, sendo que o comprometimento de linfonodos e presença de metástases, incluem os tumores no grupo dos avançados, com 86,1% da nossa casuística. A metástase ao diagnóstico foi encontrada em 70,8% dos casos estudados, o que classificou estes pacientes com doença avançada e a sua inclusão para determinação dos critérios do IGCCCG, com 67,8% dos casos classificados como baixo risco do tratamento.

Considerando a primeira análise, em relação a curva ROC, não encontramos um ponto de corte capaz de discriminar casos tumorais e controles com uma alta sensibilidade, apesar de em alguns casos apresentam alta especificidade. O mesmo foi observado no trabalho desenvolvido por Brait et al.³⁸ avaliando a metilação de 15 genes em 57 amostras de TCGTs utilizando a QMSP.

Dessa forma, considerando o modelo de sensibilidade desses tumores e a casuística de casos refratários, optamos pela análise da curva ROC para determinar o nível de metilação que pudesse ser relevante para discriminar o desfecho clínico desses pacientes. Os resultados encontrados para cada gene será discutido a seguir.

Gene VGF

O gene *VGF* está localizado no cromossomo 7q22.1 e exerce sua função no metabolismo basal, nutrição, regulação homeostática e no sistema nervoso central. Hoque et al.⁸² identificaram *VGF* como um gene frequentemente metilado em um estudo de larga

escala, colaborando com a descrição de um mapa epigenômico da metilação do DNA em diversos tipos tumorais. Após o *VGF* ter sido apontado como um gene frequentemente metilado nesse estudo de larga escala, Brait et al., em 2012³⁸ analisaram pela primeira vez a metilação de *VGF* em TCGTs através da técnica de QMSP, e encontraram uma metilação significativa ($p=0.008$) em 14 dos 57 tumores estudados, enquanto nenhum dos tecidos normais apresentou metilação.

No presente estudo, a metilação foi descrita em 10 dos 72 casos tumorais, e destes, seis apresentaram marcadores séricos elevados com uma associação significativa. Apesar de não ser significativo, 100% dos tumores metilados pertenciam ao estadió avançado, concordando com o fato de que a elevação dos níveis dos marcadores séricos, podem indicar o avanço da doença. Em relação à sobrevida global, apesar de não significativo, pacientes cujos tumores apresentaram a metilação de *VGF* têm uma menor estimativa de sobrevida global, assim como sobrevida livre de eventos.

No estudo realizado por Hoque et al., em 2014⁸³, em carcinomas uroteliais, os autores sugerem que a metilação frequente de *VGF* encontrada possa ser um evento inicial no desenvolvimento dessa doença. Já em TCGTs isso não está claro, sendo necessário um estudo comparando a metilação do gene entre tumores primários e sítios metastáticos para estabelecer a participação desta alteração epigenética na progressão tumoral.

Gene *MGMT*

Apesar da sensibilidade dos TCGTs à quimioterapia, mesmo em casos metastáticos, alguns pacientes falham em responder ao tratamento inicial e tem um pior prognóstico⁸⁴. Cerca de 20-30% dos tumores metastáticos são refratários à primeira linha de tratamento, representando um grupo propenso à menor sobrevida e tornando o manejo de pacientes com prognóstico adverso, um desafio terapêutico⁸⁵.

A necessidade de regimes de tratamento alternativos para essa população refratária faz com que estudos sobre a base molecular desses tumores sejam mais frequentes, e talvez a adição de uma nova droga com mecanismos de ação moleculares diferentes possa ter um impacto positivo no desfecho do tratamento⁸⁶.

Feldman et al.,⁸⁶ estudaram tumores refratários em 65 TCGTs primários que foram submetidos a diferentes linhas de tratamento com novos agentes, entre eles a

temozolomida, e detectaram uma alta frequência de mortalidade nesses casos. O início dos testes dessa droga com TCGTs foi um estudo que detectou que linhagens celulares derivadas de TCGTs não seminomatosos eram extremamente sensíveis à temozolomida, sugerindo que essa droga tenha um efeito em casos refratários⁸⁷.

A temozolomida pertence a uma classe de agentes alquilantes e tem se mostrado eficaz no tratamento de glioblastomas, principalmente para aqueles tumores metilados para o gene *MGMT*⁸⁸. Esse gene codifica uma proteína de reparo do DNA que remove as lesões provocadas por agentes quimioterapêuticos alquilantes, como a temozolomida e devido ao seu papel crítico no reparo do DNA, o silenciamento epigenético do *MGMT* está associado a um prognóstico favorável em glioblastomas, tornando o estudo da metilação de *MGMT* nesse tumores particularmente interessante⁸⁹.

O *MGMT* tem sido frequentemente reportado como metilado em TCGTs⁹⁰, com 69% de tumores não seminomas metilados. No presente estudo, uma associação significativa foi encontrada em relação ao grupo histológico, em que 90,9% dos casos metilados eram pertencentes ao grupo dos não seminomas, e ainda com a análise de regressão logística isso foi mais evidenciado, sendo que tumores não seminomatosos apresentaram 5,62 vezes maior chance de apresentar o *MGMT* metilado. Ainda, dos tumores metilados, 61,9% foram sensíveis ao tratamento, como foi encontrado por , Koul et al., em um trabalho onde estudaram 22 genes em 39 tumores não seminomas resistentes à quimioterapia e 31 tumores sensíveis, e identificaram a metilação de *MGMT* como sendo mais frequente nos tumores sensíveis (31% vs 13%), sugerindo que a inativação do *MGMT* por alterações epigenéticas conferem uma sensibilidade à cisplatina.

Foi encontrado uma associação significativa na sobrevida livre de eventos para casos com metilação do promotor em *MGMT*, com uma menor sobrevida (50,5%) em 5 anos, com outros fatores que influenciam a progressão da doença.

Baseando-se nos dados observados nos estudos citados, é possível que a metilação de *MGMT* em TCGTs esteja associado a tumores sensíveis, e que uma investigação das alterações epigenéticas à cerca destes casos seja importante para melhorar o tratamento dos tumores refratários.

Gene *HOXA9*

O gene *HOXA9* está inserido na família dos genes *Homeobox* (HOX), os quais são fatores de transcrição que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento, regulando processos como embriogênese, apoptose, diferenciação, motilidade e angiogênese. Podem estar super expressos e atuar como oncogenes, ou podem atuar como genes supressores tumorais quando sua expressão está regulada pela metilação do promotor⁹¹. Sabe-se que as ilhas CpG dos promotores dos genes Hox silenciados são descritas como frequentemente metiladas⁹² e alguns dos genes são epigeneticamente silenciados em neuroblastomas⁹¹.

A metilação do *HOXA9* já foi descrita como frequente em câncer de cavidade oral por Uchida et al.⁹³, sendo que uma baixa expressão desse gene está relacionada com o crescimento desses tumores. Além disso, já foi descrito a metilação e a perda da expressão de *HOXA9* em câncer de mama, pulmão, ovário e bexiga⁹⁴⁻⁹⁶.

No presente estudo, a metilação do gene *HOXA9* foi associada com uma idade menor que 29,6 anos e associada com o grupo histológico dos não seminomas, sendo que 100% dos casos metilados eram desse grupo. Amatruda et al.⁴³, identificaram para tumores de células germinativas pediátricos, a associação da metilação desse gene principalmente com os tumores de seio endodérmico (que pertencem ao grupo dos não seminomas). Nossos resultados demonstram que dos casos tumorais metilados, 14,3% eram tumores de seio endodérmico e 64,3% tumores mistos, porém em 6 desses tumores mistos havia um componente de seio endodérmico.

Os pacientes com metilação do gene *HOXA9* apresentaram menores estimativas de sobrevida global 74,6% em relação aos não metilados, em 5 anos, mas não houve diferença significativa.

Apesar do presente estudo não ter encontrado uma associação significativa para a metilação do *HOXA9* em relação a ocorrência dos TCGTs, ele já foi descrito como hipermetilado e conferindo pior prognóstico para câncer de pulmão, neuroblastomas e gliomas, o que chama a atenção para a importância do tipo de tecido estudado e o desenvolvimento do câncer⁹⁷.

Gene *ADAMTS1*

A função de *ADAMTS1* foi descrita inicialmente como mediador de inflamação, mas também exerce função na angiogênese, proliferação, invasão e migração. Faz parte da

família das metaloproteases e sua função é remodelar a matriz extracelular através da degradação proteolítica. *ADAMTS1* também atua como um inibidor da angiogênese, mas a sua desregulação pode levar a uma alteração da matriz extracelular⁹⁸. De maneira interessante, no processo da tumorigênese a célula maligna necessita remodelar o ambiente para estabelecer o suprimento vascular e invasão, e muitos estudos tem relatado a atividade de *ADAMTS1* durante a transformação maligna.

O silenciamento epigenético através da hipermetilação do promotor de *ADAMTS1* já foi descrito em câncer de pulmão, próstata e câncer coloretal, enquanto uma baixa expressão de *ADAMTS1* foi frequentemente reportada em tumores primários de próstata quando comparados aos seus respectivos tecidos normais⁹⁹.

No presente trabalho, dos 72 tumores avaliados, 3 apresentaram-se como hipermetilados para o gene *ADAMTS1* e embora todos os tumores metilados pertencessem ao grupo dos não seminomas, eles não foram coincidentes na sua histologia. Pode-se observar que a metilação foi predominante em casos metastáticos, e que isso refletiu na classificação de risco desses tumores como intermediário e alto, concentrando 100% dos casos metilados. Em relação a metástase, sabe-se que para o câncer de próstata, uma queda na expressão de *ADAMTS1* está associada a progressão da doença^{98, 100}. A regressão logística múltipla não estabeleceu nenhuma associação significativa entre as variáveis com $p < 0,2$. Apesar da baixa casuística e de não encontrarmos associação significativa, os casos metilados apresentaram uma menor sobrevida global e uma menor sobrevida livre de eventos em relação a metilação de *ADAMTS1*.

Como observado, nossos achados demonstram que a metilação do *ADAMTS1* não parece ser um evento frequente nos TCGTs, entretanto parece estar associada a pacientes com características mais agressivas do tumor. De qualquer forma, nossos dados devem ser avaliados com cautela, uma vez que apenas três amostras apresentaram metilação, sendo necessário uma avaliação mais abrangente deste gene para elucidar o real impacto de sua metilação nesta doença.

Gene *CALCA*

O gene da calcitonina está localizado na região 11p15.2 e é responsável por regular níveis de cálcio via adenilato ciclases. A correlação da metilação do *CALCA* com sua

expressão gênica não é muito clara, porém sabe-se que tecidos de carcinoma de pulmão não pequenas células e carcinoma de fígado expressam a sua proteína¹⁰¹.

No estudo com linhagens gliais e tumores primários tratados com 5-azacitidina, a expressão de *CALCA* foi induzida, demonstrando que a metilação é capaz de reprimir a expressão do mesmo¹⁰¹. Esse gene já foi demonstrado como hipermetilado em câncer de tireóide¹⁰² e também já foi estudado em câncer cervical, onde a metilação de *CALCA* foi identificada em soro em 87% das 65 amostras estudadas, porém não correlacionando nenhum significado prognóstico nesses pacientes⁶¹.

Nosso estudo identificou uma associação significativa entre metilação e não seminomas, em 90,5% dos casos e evidenciou isso na regressão logística, pois tumores não seminomas apresentaram 9,94 vezes mais chance de estar metilado para *CALCA*. A análise de metilação para *CALCA* também chamou atenção para a associação encontrada em relação à quimiossensibilidade desses tumores, sendo que tumores refratários tinham 4,64 vezes maior chance de ser metilado para esse gene. E ainda, a metilação de *CALCA* foi estatisticamente significativa para a sobrevida livre de eventos, apresentando 51,3% de SLE em 5 anos, comparado a 70,7% em 5 anos para os casos que não eram metilados.

Acreditamos que a regulação epigenética de *CALCA* para TCGTs esteja relacionada aos tumores mais diferenciados e mais agressivos, porém mais estudos são necessários para esclarecer esse papel.

Gene *CDO1*

CDO é uma enzima vital humana envolvida na regulação da cisteína no corpo humano e tem um papel importante na biossíntese da taurina. A região cromossômica em que está localizado o gene *CDO1* foi descrita, por Staub et al.⁵⁹, como epigeneticamente silenciada contribuindo com o câncer colorretal.

Brait et al.⁶⁰, verificaram que o promotor de *CDO1* era diferencialmente metilado em tecidos primários de câncer colorretal quando comparados ao tecido normal e ainda que a expressão de *CDO1* era controlada pela metilação do promotor, sugerindo que o silenciamento de *CDO1* deve ser um evento comum na carcinogênese. Também verificaram uma diferença estatisticamente significativa na frequência da metilação do promotor entre tumores primários e tecidos normais em tecidos derivados de cólon, mama, esôfago, pulmão, bexiga e estômago. Apesar de não significativa, na primeira análise neste trabalho,

nenhuma amostra de testículo normal apresentou metilação e quatro amostras tumorais foram metiladas.

A sugestão de que *CDO1* é um gene supressor tumoral epigeneticamente regulado em câncer ganhou força com Brait et al.⁶⁰, após o teste com 5 linhagens de câncer colorretal, em que a expressão de *CDO1* estava silenciada e foi reativada após o tratamento com a droga demetilante 5-azacitidina.

Os nossos resultados revelaram que as amostras tumorais metiladas foram associadas com metástase ao diagnóstico, assim como o estudo de Dietrich et al.¹⁰³, que associou a progressão da doença com a metilação de *CDO1*. Ainda, os tumores metilados foram mais refratários ao tratamento quando comparados àqueles tumores não metilados, apresentando 11,5 vezes maior chance de estar metilado quando refratários. Foi observado que a metilação implicou em uma menor sobrevida global desses pacientes, pois casos que evoluíram para óbito apresentaram 9 vezes mais chance de estar metilado para *CDO1*, sugerindo a metilação como um fator de risco para esses tumores.

Wrangle et al.¹⁰⁴, identificaram um painel de genes envolvendo a metilação de *CDO1* e *HOXA9* e demonstrou 100% de especificidade e entre 83 e 99% de sensibilidade para o uso desses marcadores para o diagnóstico de câncer de pulmão não pequenas células.

As características citadas merecem atenção em relação a metilação do gene *CDO1* e seu potencial uso como biomarcador para o diagnóstico de algumas neoplasias, porém, seu estudo em TCGTs necessita de uma avaliação mais ampla.

Gene *CDKN2B*

O *locus* CDKN2b-CDKN2a, está localizado no cromossomo 9p21 e é frequentemente deletado em câncer. Este *locus* codifica três proteínas inibidoras de ciclo celular: p15INK4b (codificado por *CDKN2B*), p16INK4a (codificado por *CDKN2A*) e p14ARF¹⁰⁵.

A proteína codificada pelo gene *CDKN2B* é capaz de induzir parada de ciclo celular em G1 inibindo as proteínas quinases ciclina-dependentes CDK4 e CDK6, que são responsáveis pela fosforilação da proteína RB. A fosforilação de RB é considerada como sendo crítica para a progressão através da fase G1 e entrada na fase S do ciclo celular¹⁰⁶. Dessa maneira, *CDKN2B* apresenta uma atividade supressora tumoral, pois inibe a progressão de células tumorais e o avanço da doença.

O estudo dos mecanismos epigenéticos como a metilação de *CDKN2B* já foi descrito em uma variedade de tipos de câncer^{34, 107}. A hipermetilação de *CDKN2B* pode atuar como um fator prognóstico em glioblastomas, pois pode atuar como um fator preditivo para a resposta ao tratamento por temozolomida¹⁰⁸.

Em relação a TCGTs, Heidenreich et al.¹⁰⁹, não encontraram mutações envolvendo *CDKN2B* e concluíram que esse gene não possui papel no surgimento e controle desta doença, porém, não foi realizado o estudo epigenético com esses tumores.

Em nosso estudo, não foi encontrada nenhuma associação significativa da metilação de *CDKN2B* e variáveis clínicas apesar de alguns tumores apresentarem hipermetilação deste gene. Entretanto, acreditamos que o reestabelecimento da função normal desse gene possa ser uma alternativa à terapia e mais estudos devem ser realizados com TCGTs na busca por novos tratamentos.

Gene *NANOG*

O *NANOG* é descrito como um importante fator na regulação da pluripotência e sua expressão durante o desenvolvimento embrionário acontece em células pluripotentes, como as células germinativas primordiais¹¹⁰. Está localizado no cromossomo 12p13, na região em que ocorre a alteração citogenética mais frequente em TCGTs, o i(12p). É de conhecimento que a reativação da pluripotência através de mecanismos epigenéticos é um dos eventos iniciais da proliferação tumoral, portanto o estudo da regulação epigenética de *NANOG* em tumores germinativos busca elucidar mecanismos da origem desse tumor.

Hart et al.⁵⁴, identificaram através da técnica de imunohistoquímica, que a expressão de *NANOG* está presente em estágios mais indiferenciados dos TCGTs, como a lesão intratubular e seminomas, e não em teratomas e tumores de seio endodérmico, sendo um marcador importante para a identificação e classificação dos tumores de origem germinativa com menor grau de diferenciação.

A análise dos mecanismos de regulação epigenética do *NANOG* foi realizada em tumores primários de carcinoma hepatocelular, sendo que a hipometilação de *NANOG* foi predominante entre os tumores e uma associação significativa foi encontrada para a alta expressão de *NANOG* em tecidos tumorais mais agressivos¹¹¹.

A análise da metilação de *NANOG* em TCGTs não havia sido descrita, e o nosso trabalho não demonstrou nenhuma associação significativa com as variáveis clínicas

estudadas, porém a relação do desenvolvimento desses tumores e a função desse gene torna a pesquisa pelo perfil de metilação uma área de interesse.

Os genes avaliados foram agrupados e foi possível observar o predomínio de metilação em mais de dois genes em 94,7% dos tumores não seminomas. O predomínio da metilação nesse grupo foi descrito primeiramente por Peltomaki⁴⁰, seguido por Smiraglia et al.⁴¹ e Netto et al.⁴², todos concordantes de que o grupo dos seminomas permanecem não metilados enquanto a hipermetilação é predominante em tumores não seminomatosos.

De uma maneira geral, observamos uma menor sobrevida global e sobrevida livre de eventos para os casos que apresentaram metilação dos genes avaliados, indicando que o silenciamento epigenético dos genes supressores tumorais estudados pode atuar no desfecho clínico desse grupo.

Embora uma alta presença de resposta sensível tenha sido apresentada para os casos, é importante mencionar que nem todos os pacientes incluídos no estudo tiveram um seguimento até 5 anos após o tratamento, devido a inclusão de amostras do ano de 2012, sabendo que pacientes que sobreviveram à doença tem um risco de recaída ainda 2 anos após a remissão da doença¹¹². Em relação ao risco do tratamento, uma associação significativa foi encontrada para a sobrevida global, e pacientes com alto risco obtiveram um seguimento somente de 3 anos. É importante mencionar que 13 pacientes não foram incluídos na classificação de risco pois eram estadio I da doença.

As variáveis clínicas que conhecidamente possuem valor prognóstico foram reproduzidas neste estudo em acordo com a literatura, apesar da pequena casuística. É necessário uma avaliação mais abrangente do valor da metilação de *CALCA* e *CDO1* no estabelecimento da refratariedade da doença, assim como a real associação da metilação da *MGMT* com os desfechos clínicos.

7 CONCLUSÕES

- Não encontramos diferenças significativas entre o nível médio de metilação dos oito genes na comparação entre tecidos controle e tumores de células germinativas de testículo;
- A metilação do gene *VGF* foi associada a pacientes com níveis alterados de marcadores séricos (S2 ou S3);
- A metilação do gene *MGMT* foi associada a pacientes com tumores não seminomatosos;
- A metilação do gene *ADAMTS1* foi associada a pacientes com presença de pelo menos um sítio metastático e pacientes classificados com risco intermediário ou alto (IGCCCG);
- A metilação do gene *CALCA* foi associada a pacientes com tumores não seminomatosos e pacientes refratários ao tratamento;
- A metilação do gene *HOXA9* foi associada a pacientes com idade mais avançada (acima de 29,6 anos) e pacientes com tumores não seminomatosos;
- A metilação do gene *CDO1* foi associada a pacientes com presença de pelos menos um sítio metastático, classificados nas categorias de maior risco (IGCCCG) e refratários ao tratamento;
- A metilação do gene *CDKN2B* e *NANOG* não foi associada com as características clínico-patológicas avaliadas;
- Considerando os oito genes avaliados, a combinação de metilação presente em mais de dois destes genes foi associada a pacientes com tumores não seminomatosos;

- A metilação dos genes avaliados não tem impacto nas estimativas de sobrevida global;
- A metilação dos genes *MGMT* e *CALCA* tem impacto negativo nas estimativas de sobrevida livre de eventos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palmer RD, Foster NA, Vowler SL, Roberts I, Thornton CM, Hale JP, et al. *Malignant germ cell tumours of childhood: new associations of genomic imbalance*. **Br J Cancer**. 2007;96(4):667-76.
2. Brown N. *Teratomas and yolk-sac tumours*. **J Clin Pathol**. 1976;29(11):5.
3. Masters JR, Koberle B. *Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours*. **Nat Rev Cancer**. 2003;3(7):517-25.
4. Eble JS, G. Epstein, JI. Sesterhenn, IA., editor. *Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. **Lyon: IARC Press**; 2004.
5. Fritz AP, C. Jack, A. Shanmugaratnam, K. Sobin, L.H. Parkin, M.D. . *International Classification of Disease for Oncology*. 2000.
6. Greene MH, Kratz CP, Mai PL, Mueller C, Peters JA, Bratslavsky G, et al. *Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype*. **Endocr Relat Cancer**. 2010;17(2):R109-21.
7. Houldsworth J, Korkola JE, Bosl GJ, Chaganti RS. *Biology and genetics of adult male germ cell tumors*. **J Clin Oncol**. 2006;24(35):5512-8.
8. Lopes LF, Macedo CR, Pontes EM, Dos Santos Aguiar S, Mastellaro MJ, Melaragno R, et al. *Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91*. **J Clin Oncol**. 2009;27(8):1297-303.
9. Cheng L, Sung MT, Cossu-Rocca P, Jones TD, MacLennan GT, De Jong J, et al. *OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia*. **J Pathol**. 2007;211(1):1-9.
10. *Cancer facts and figures*. American Cancer Society [Internet]. 2012.
11. Oldenburg J, Fossa SD, Nuver J, Heidenreich A, Schmoll HJ, Bokemeyer C, et al. *Testicular seminoma and non-seminoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. **Ann Oncol**. 2013;24 Suppl 6:vi125-32.
12. *Guidelines on testicular cancer*, (2012).
13. *International Germ Cell Consensus Classification: a prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers*. International Germ Cell Cancer Collaborative Group. **J Clin Oncol**. 1997;15(2):594-603.

14. Atkin NB, Baker MC. *Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours?* **Lancet.** 1982;2(8311):1349.
15. de Jong B, van Echten J, Looijenga LH, Geurts van Kessel A, Oosterhuis JW. *Cytogenetics of the progression of adult testicular germ cell tumors.* **Cancer Genet Cytogenet.** 1997;95(1):88-95.
16. Kraggerud SM, Skotheim RI, Szymanska J, Eknaes M, Fossa SD, Stenwig AE, et al. *Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2002;34(2):168-74.
17. Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Calaminus G, Gobel U, Harms D, et al. *Genetic analysis of mediastinal nonseminomatous germ cell tumors in children and adolescents.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2002;34(1):115-25.
18. Lutzker SG. *P53 tumour suppressor gene and germ cell neoplasia.* **Apmis.** 1998;106(1):85-9.
19. Cárcano FM, Vidal DO, Lengert AH, Scapulatempo Neto C, Queiroz L, Marques H, et al. *Hotspot TERT promoter mutations are rare events in testicular germ cell tumors.* 2015.
20. Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. *Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis.* **Hum Reprod Update.** 1999;5(5):535-45.
21. Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJ, Stoop H, Gillis AJ, et al. *Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors.* **Cancer Res.** 2003;63(22):7674-8.
22. Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer.* **Mutat Res.** 2008;642(1-2):1-13.
23. Ichikawa M, Arai Y, Haruta M, Furukawa S, Ariga T, Kajii T, et al. *Meiosis error and subsequent genetic and epigenetic alterations invoke the malignant transformation of germ cell tumor.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2013;52(3):274-86.
24. Bird A. *DNA methylation patterns and epigenetic memory.* **Genes Dev.** 2002;16(1):6-21.
25. Han L, Zhao Z. *CpG islands or CpG clusters: how to identify functional GC-rich regions in a genome?* **BMC Bioinformatics.** 2009;10:65.
26. Antequera F, Bird A. *CpG islands.* **Exs.** 1993;64:169-85.

27. Baubec T, Colombo DF, Wirbelauer C, Schmidt J, Burger L, Krebs AR, et al. *Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation.* **Nature.** 2015.
28. Allegrucci C, Thurston A, Lucas E, Young L. *Epigenetics and the germline.* **Reproduction.** 2005;129(2):137-49.
29. Fahy J, Jeltsch A, Arimondo PB. *DNA methyltransferase inhibitors in cancer: a chemical and therapeutic patent overview and selected clinical studies.* **Expert Opin Ther Pat.** 2012;22(12):1427-42.
30. Ritchie EK. *Safety and efficacy of azacitidine in the treatment of elderly patients with myelodysplastic syndrome.* **Clin Interv Aging.** 2012;7:165-73.
31. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. *The epigenetic progenitor origin of human cancer.* **Nat Rev Genet.** 2006;7(1):21-33.
32. Feinberg AP, Tycko B. *The history of cancer epigenetics.* **Nat Rev Cancer.** 2004;4(2):143-53.
33. Taberlay PC, Jones PA. *DNA methylation and cancer.* **Prog Drug Res.** 2011;67:1-23.
34. Esteller M. *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.* **Oncogene.** 2002;21(35):5427-40.
35. Ehrlich M. *DNA hypomethylation in cancer cells.* **Epigenomics.** 2009;1(2):239-59.
36. Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma.* **Hum Genet.** 1989;83(2):155-8.
37. Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA. *The epigenome of testicular germ cell tumors.* **Apmis.** 2007;115(10):1147-60.
38. Brait M, Maldonado L, Begum S, Loyo M, Wehle D, Tavora FF, et al. *DNA methylation profiles delineate epigenetic heterogeneity in seminoma and non-seminoma.* **Br J Cancer.** 2012;106(2):414-23.
39. Horwich A, Shipley J, Huddart R. *Testicular germ-cell cancer.* **Lancet.** 2006;367(9512):754-65.
40. Peltomaki P. *DNA methylation changes in human testicular cancer.* **Biochim Biophys Acta.** 1991;1096(3):187-96.

41. Smiraglia DJ, Szymanska J, Kraggerud SM, Lothe RA, Peltomaki P, Plass C. *Distinct epigenetic phenotypes in seminomatous and nonseminomatous testicular germ cell tumors*. **Oncogene**. 2002;21(24):3909-16.
42. Netto GJ, Nakai Y, Nakayama M, Jadallah S, Toubaji A, Nonomura N, et al. *Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors*. **Mod Pathol**. 2008;21(11):1337-44.
43. Amatruda JF, Ross JA, Christensen B, Fustino NJ, Chen KS, Hooten AJ, et al. *DNA methylation analysis reveals distinct methylation signatures in pediatric germ cell tumors*. **BMC Cancer**. 2013;13:313.
44. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
45. Povey AC, Badawi AF, Cooper DP, Hall CN, Harrison KL, Jackson PE, et al. *DNA alkylation and repair in the large bowel: animal and human studies*. **J Nutr**. 2002;132(11 Suppl):3518s-21s.
46. Watts GS, Pieper RO, Costello JF, Peng YM, Dalton WS, Futscher BW. *Methylation of discrete regions of the O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) CpG island is associated with heterochromatinization of the MGMT transcription start site and silencing of the gene*. **Mol Cell Biol**. 1997;17(9):5612-9.
47. Mendez G, Ozpinar A, Raskin J, Gultekin SH, Ross DA. *Case comparison and literature review of glioblastoma: A tale of two tumors*. **Surg Neurol Int**. 2014;5:121.
48. Shimazawa M, Tanaka H, Ito Y, Morimoto N, Tsuruma K, Kadokura M, et al. *An inducer of VGF protects cells against ER stress-induced cell death and prolongs survival in the mutant SOD1 animal models of familial ALS*. **PLoS One**. 2010;5(12):e15307.
49. Brait M, Maldonado L, Noordhuis MG, Begum S, Loyo M, Poeta ML, et al. *Association of promoter methylation of VGF and PGP9.5 with ovarian cancer progression*. **PLoS One**. 2013;8(9):e70878.
50. Ostrow KL, Park HL, Hoque MO, Kim MS, Liu J, Argani P, et al. *Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced genes in breast cancer*. **Clin Cancer Res**. 2009;15(4):1184-91.
51. Ruetschi U, Zetterberg H, Podust VN, Gottfries J, Li S, Hviid Simonsen A, et al. *Identification of CSF biomarkers for frontotemporal dementia using SELDI-TOF*. **Exp Neurol**. 2005;196(2):273-81.
52. Ahlquist T, Lind GE, Costa VL, Meling GI, Vatn M, Hoff GS, et al. *Gene methylation profiles of normal mucosa, and benign and malignant colorectal tumors identify early onset markers*. **Mol Cancer**. 2008;7:94.

53. Lind GE, Skotheim RI, Fraga MF, Abeler VM, Esteller M, Lothe RA. *Novel epigenetically deregulated genes in testicular cancer include homeobox genes and SCGB3A1 (HIN-1)*. **J Pathol.** 2006;210(4):441-9.
54. Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LH, Pauchnik M, et al. *The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors*. **Cancer.** 2005;104(10):2092-8.
55. Tommasi S, Zheng A, Yoon JI, Besaratinia A. *Epigenetic targeting of the Nanog pathway and signaling networks during chemical carcinogenesis*. **Carcinogenesis.** 2014;35(8):1726-36.
56. Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. *Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications*. **Blood.** 2000;95(6):1942-9.
57. Kim M, Kook H, Park HJ, Ahn HS, Lee KC, Lee KS, et al. *Quantitative comparison of CDKN2B methylation in pediatric and adult myelodysplastic syndromes*. **Acta Haematol.** 2013;130(2):115-21.
58. Vidal DO, Paixao VA, Brait M, Souto EX, Caballero OL, Lopes LF, et al. *Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome*. **Leuk Res.** 2007;31(2):175-81.
59. Staub E, Grone J, Mennerich D, Ropcke S, Klamann I, Hinzmann B, et al. *A genome-wide map of aberrantly expressed chromosomal islands in colorectal cancer*. **Mol Cancer.** 2006;5:37.
60. Brait M, Ling S, Nagpal JK, Chang X, Park HL, Lee J, et al. *Cysteine dioxygenase 1 is a tumor suppressor gene silenced by promoter methylation in multiple human cancers*. **PLoS One.** 2012;7(9):e44951.
61. Widschwendter A, Muller HM, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Muller-Holzner E, et al. *DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients*. **Clin Cancer Res.** 2004;10(2):565-71.
62. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. *Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients*. **Cancer Res.** 1999;59(1):67-70.
63. Rocks N, Paulissen G, El Hour M, Quesada F, Crahay C, Gueders M, et al. *Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer*. **Biochimie.** 2008;90(2):369-79.
64. Freitas VM, do Amaral JB, Silva TA, Santos ES, Mangone FR, Pinheiro Jde J, et al. *Decreased expression of ADAMTS-1 in human breast tumors stimulates migration and invasion*. **Mol Cancer.** 2013;12:2.

65. Yegnasubramanian S, Wu Z, Haffner MC, Esopi D, Aryee MJ, Badrinath R, et al. *Chromosome-wide mapping of DNA methylation patterns in normal and malignant prostate cells reveals pervasive methylation of gene-associated and conserved intergenic sequences.* **BMC Genomics.** 2011;12:313.
66. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, et al. *MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation.* **Nucleic Acids Res.** 2000;28(8):E32.
67. Guerrero-Preston R, Soudry E, Acero J, Orera M, Moreno-Lopez L, Macia-Colon G, et al. *NID2 and HOXA9 promoter hypermethylation as biomarkers for prevention and early detection in oral cavity squamous cell carcinoma tissues and saliva.* **Cancer Prev Res (Phila).** 2011;4(7):1061-72.
68. Yamashita K, Waraya M, Kim MS, Sidransky D, Katada N, Sato T, et al. *Detection of methylated CDO1 in plasma of colorectal cancer; a PCR study.* **PLoS One.** 2014;9(12):e113546.
69. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. *Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma.* **Cancer Res.** 2001;61(8):3410-8.
70. Kent WJ. *BLAT--the BLAST-like alignment tool.* **Genome Res.** 2002;12(4):656-64.
71. Li LC, Dahiya R. *MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.* **Bioinformatics.** 2002;18(11):1427-31.
72. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1992;89(5):1827-31.
73. Li Y, Tollefsbol TO. *DNA methylation detection: bisulfite genomic sequencing analysis.* **Methods Mol Biol.** 2011;791:11-21.
74. Okamoto K. *Epigenetics: a way to understand the origin and biology of testicular germ cell tumors.* **Int J Urol.** 2012;19(6):504-11.
75. Kristensen DG, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. *Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells.* **Int J Dev Biol.** 2013;57(2-4):309-17.
76. Kristensen DG, Nielsen JE, Jorgensen A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. *Evidence that active demethylation mechanisms maintain the genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis.* **Br J Cancer.** 2014;110(3):668-78.

77. Ota N, Kawakami K, Okuda T, Takehara A, Hiranuma C, Oyama K, et al. *Prognostic significance of p16(INK4a) hypermethylation in non-small cell lung cancer is evident by quantitative DNA methylation analysis.* **Anticancer Res.** 2006;26(5b):3729-32.
78. Huyghe E, Muller A, Mieusset R, Bujan L, Bachaud JM, Chevreau C, et al. *Impact of diagnostic delay in testis cancer: results of a large population-based study.* **Eur Urol.** 2007;52(6):1710-6.
79. Yetisyigit T, Babacan N, Urun Y, Seber ES, Cihan S, Arpaci E, et al. *Predictors of outcome in patients with advanced nonseminomatous germ cell testicular tumors.* **Asian Pac J Cancer Prev.** 2014;15(2):831-5.
80. Ozgun A, Karagoz B, Tuncel T, Emirzeoglu L, Celik S, Bilgi O. *Clinicopathological features and survival of young Turkish patients with testicular germ cell tumors.* **Asian Pac J Cancer Prev.** 2013;14(11):6889-92.
81. Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB, McGlynn KA. *International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2010;19(5):1151-9.
82. Hoque MO, Kim MS, Ostrow KL, Liu J, Wisman GB, Park HL, et al. *Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome.* **Cancer Res.** 2008;68(8):2661-70.
83. Hayashi M, Bernert H, Kagohara LT, Maldonado L, Brait M, Schoenberg M, et al. *Epigenetic inactivation of VGF associated with Urothelial Cell Carcinoma and its potential as a non-invasive biomarker using urine.* **Oncotarget.** 2014;5(10):3350-61.
84. Porcu P, Bhatia S, Sharma M, Einhorn LH. *Results of treatment after relapse from high-dose chemotherapy in germ cell tumors.* **J Clin Oncol.** 2000;18(6):1181-6.
85. Maroto P, Huddart R, Garcia del Muro X, Horwich A, Paz Ares L, Aparicio J, et al. *Brief report: phase II multicenter study of temozolomide in patients with cisplatin-resistant germ cell tumors.* **Oncology.** 2011;80(3-4):219-22.
86. Feldman DR, Patil S, Trinos MJ, Carousso M, Ginsberg MS, Sheinfeld J, et al. *Progression-free and overall survival in patients with relapsed/refractory germ cell tumors treated with single-agent chemotherapy: endpoints for clinical trial design.* **Cancer.** 2012;118(4):981-6.
87. Pera MF, Koberle B, Masters JR. *Exceptional sensitivity of testicular germ cell tumour cell lines to the new anti-cancer agent, temozolomide.* **Br J Cancer.** 1995;71(5):904-6.
88. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* **N Engl J Med.** 2000;343(19):1350-4.

89. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. *MGMT testing-the challenges for biomarker-based glioma treatment*. **Nat Rev Neurol**. 2014;10(7):372-85.
90. Smith-Sorensen B, Lind GE, Skotheim RI, Fossa SD, Fodstad O, Stenwig AE, et al. *Frequent promoter hypermethylation of the O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene in testicular cancer*. **Oncogene**. 2002;21(57):8878-84.
91. Shah N, Sukumar S. *The Hox genes and their roles in oncogenesis*. **Nat Rev Cancer**. 2010;10(5):361-71.
92. Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, et al. *Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007;104(13):5527-32.
93. Uchida K, Veeramachaneni R, Huey B, Bhattacharya A, Schmidt BL, Albertson DG. *Investigation of HOXA9 promoter methylation as a biomarker to distinguish oral cancer patients at low risk of neck metastasis*. **BMC Cancer**. 2014;14:353.
94. Gilbert PM, Mouw JK, Unger MA, Lakins JN, Gbegnon MK, Clemmer VB, et al. *HOXA9 regulates BRCA1 expression to modulate human breast tumor phenotype*. **J Clin Invest**. 2010;120(5):1535-50.
95. Son JW, Jeong KJ, Jean WS, Park SY, Jheon S, Cho HM, et al. *Genome-wide combination profiling of DNA copy number and methylation for deciphering biomarkers in non-small cell lung cancer patients*. **Cancer Lett**. 2011;311(1):29-37.
96. Wu Q, Lothe RA, Ahlquist T, Silins I, Trope CG, Micci F, et al. *DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their in vitro models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets*. **Mol Cancer**. 2007;6:45.
97. Di Vinci A, Casciano I, Marasco E, Banelli B, Ravetti GL, Borzi L, et al. *Quantitative methylation analysis of HOXA3, 7, 9, and 10 genes in glioma: association with tumor WHO grade and clinical outcome*. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2012;138(1):35-47.
98. Tan Ide A, Ricciardelli C, Russell DL. *The metalloproteinase ADAMTS1: a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways*. **Int J Cancer**. 2013;133(10):2263-76.
99. Gustavsson H, Jennbacken K, Welen K, Damberg JE. *Altered expression of genes regulating angiogenesis in experimental androgen-independent prostate cancer*. **Prostate**. 2008;68(2):161-70.

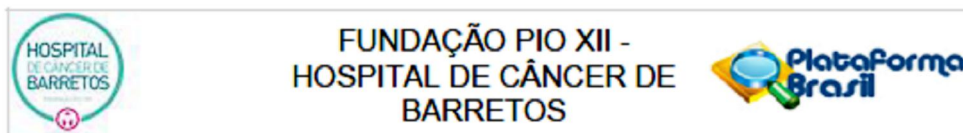
100. Varambally S, Yu J, Laxman B, Rhodes DR, Mehra R, Tomlins SA, et al. *Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression.* **Cancer Cell.** 2005;8(5):393-406.
101. Park KY, Fletcher JR, Raddant AC, Russo AF. *Epigenetic regulation of the calcitonin gene-related peptide gene in trigeminal glia.* **Cephalalgia.** 2011;31(5):614-24.
102. Hu S, Ewertz M, Tufano RP, Brait M, Carvalho AL, Liu D, et al. *Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer.* **J Clin Endocrinol Metab.** 2006;91(1):98-104.
103. Dietrich D, Krispin M, Dietrich J, Fassbender A, Lewin J, Harbeck N, et al. *CDO1 promoter methylation is a biomarker for outcome prediction of anthracycline treated, estrogen receptor-positive, lymph node-positive breast cancer patients.* **BMC Cancer.** 2010;10:247.
104. Wrangle J, Machida EO, Danilova L, Hulbert A, Franco N, Zhang W, et al. *Functional identification of cancer-specific methylation of CDO1, HOXA9, and TAC1 for the diagnosis of lung cancer.* **Clin Cancer Res.** 2014;20(7):1856-64.
105. Gil J, Peters G. *Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all.* **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2006;7(9):667-77.
106. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. *Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer.* **Biochim Biophys Acta.** 2002;1602(1):73-87.
107. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marczynek K, et al. *Distinct methylation profiles of glioma subtypes.* **Int J Cancer.** 2003;106(1):52-9.
108. Wemmert S, Bettscheider M, Alt S, Ketter R, Kammers K, Feiden W, et al. *p15 promoter methylation - a novel prognostic marker in glioblastoma patients.* **Int J Oncol.** 2009;34(6):1743-8.
109. Heidenreich A, Gaddipati JP, Moul JW, Srivastava S. *Molecular analysis of P16(Ink4)/CDKN2 and P15(INK4B)/MTS2 genes in primary human testicular germ cell tumors.* **J Urol.** 1998;159(5):1725-30.
110. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.* **Cell.** 2003;113(5):643-55.
111. Wang XQ, Ng RK, Ming X, Zhang W, Chen L, Chu AC, et al. *Epigenetic regulation of pluripotent genes mediates stem cell features in human hepatocellular carcinoma and cancer cell lines.* **PLoS One.** 2013;8(9):e72435.

112. Shinn EH, Swartz RJ, Thornton BB, Spiess PE, Pisters LL, Basen-Engquist KM. *Testis cancer survivors' health behaviors: comparison with age-matched relative and demographically matched population controls.* **J Clin Oncol.** 2010;28(13):2274-9.

Anexo A

GROUP	T	CLINICAL		
		N	M	S (serum tumor markers)
☐ 0	pTis	N0	M0	S0
☐ I	pT1–4	N0	M0	SX
☐ IA	pT1	N0	M0	S0
☐ IB	pT2	N0	M0	S0
	pT3	N0	M0	S0
	pT4	N0	M0	S0
☐ IS	Any pT/Tx	N0	M0	S1–3 (post orchiectomy)
☐ II	Any pT/Tx	N1–3	M0	SX
☐ IIA	Any pT/Tx	N1	M0	S0
	Any pT/Tx	N1	M0	S1
☐ IIB	Any pT/Tx	N2	M0	S0
	Any pT/Tx	N2	M0	S1
☐ IIC	Any pT/Tx	N3	M0	S0
	Any pT/Tx	N3	M0	S1
☐ III	Any pT/Tx	Any N	M1	SX
☐ IIIA	Any pT/Tx	Any N	M1a	S0
	Any pT/Tx	Any N	M1a	S1
☐ IIIB	Any pT/Tx	N1–3	M0	S2
	Any pT/Tx	Any N	M1a	S2
☐ IIIC	Any pT/Tx	N1–3	M0	S3
	Any pT/Tx	Any N	M1a	S3
	Any pT/Tx	Any N	M1b	Any S
☐ Stage unknown				

Anexo B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de metilação de genes alvo candidatos em tumores de células germinativas de testículo

Pesquisador: Luiz Fernando Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26848814.8.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 557.543

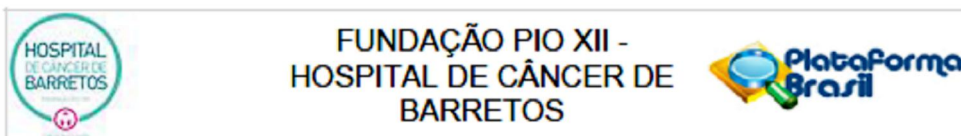
Data da Relatoria: 05/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional com coleta retrospectiva de dados, que pretende, de uma forma geral, avaliar o padrão de metilação de um grupo de 8 genes em tumores de células germinativas de testículo (seminomas e não seminomas).

Os Tumores de Células Germinativas (TCGs) fazem parte de um grupo heterogêneo e complexo de neoplasias derivado das células germinativas primordiais pluripotentes, que compreendem diferentes comportamentos clínicos, podendo ser benigno ou maligno. Há uma forte evidência de que o evento inicial na patogênese dos TCGTs ocorra durante o desenvolvimento embrionário e que apesar da variedade histológica desses tumores (seminomas e não-seminomas), estes possuem a mesma origem clonal. Dessa forma, as diferenças biológicas entre seminomas e não seminomas podem explicar o comportamento clínico e a resistência ao tratamento, e o entendimento da base molecular e genética desses tumores representa um importante avanço na busca de novos marcadores moleculares. A determinação de perfis diferenciais de metilação representa a primeira etapa na identificação de novos marcadores epigeneticamente silenciados no câncer e a diferença nos padrões de metilação de ambos os grupos pode refletir o desenvolvimento normal das células germinativas primordiais, auxiliando no entendimento da origem desses tumores. A proposta é avaliar, por meio de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-6600 **Fax:** (17)3321-6629 **E-mail:** cep@hncancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 557.543

uma abordagem de 08 genes candidatos: MGMT, VGF, HOXA9 e NANOG, os quais já foram avaliados em tumores de células germinativas e CALCA, CDKN2B, CDO1 e ADAMTS1, os quais são frequentemente hipermetilados em outros tipos tumorais, o perfil de metilação de 90 tumores de células germinativas primários de testículo (seminomas e não seminomas) e em 25 testículos normais, em busca de traçar diferenças que expliquem a etiologia dos grupos tumorais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar, por meio de uma abordagem de genes candidatos, o perfil de metilação de 90 tumores de células germinativas primários de testículo (seminomas e não seminomas) e em 25 testículos normais.

Objetivo Secundário:

1) comparar a frequência de metilação de 08 genes candidatos entre as amostras de seminomas, não seminomas e testículos normais; 2) correlacionar o perfil de metilação dos genes candidatos com as características clínico-patológicas dos pacientes; 3) correlacionar o perfil de metilação dos genes candidatos com a sobrevida dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não vai haver nenhum procedimento a mais a ser realizado fora do que é feito normalmente para o tratamento e/ou diagnóstico da doença. O material não será retirado em caso disso implicar em dificuldade no seu diagnóstico. Os dados pessoais serão mantidos em sigilo.

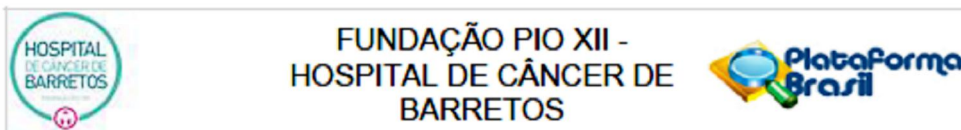
Dessa forma o principal risco seria a quebra da confidencialidade/sigilo.

Benefícios: Não há benefício direto ao sujeito do estudo. Os autores destacam, como benefício que esperam, com o presente trabalho, conhecer mais profundamente a biologia desse tumor, buscando identificar marcadores biológicos que possam estar relacionados ao prognóstico e evolução da doença no paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo simples e que pretende analisar, em material parafinado já coletado e armazenado junto ao Departamento de Patologia do HCB o padrão de metilação de 8 genes e seu possível papel na origem e diferenciação dos TCGT.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-6600 Fax: (17)3321-6629 E-mail: cep@hncancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 557.543

Os autores afirmam que, em caso de a retirada do material para o estudo comprometer, de alguma forma uma possível utilização futura do referido material para fins diagnósticos, a mesma amostra não será incluída no estudo. Os autores solicitam dispensa do TCLE e justificam da seguinte maneira: As amostras serão coletadas retrospectivamente no departamento de anatomia patológica, o qual todo o material armazenado já fora cedido pelo paciente no momento da cirurgia. O estudo propõe um risco mínimo para o paciente e considera a privacidade e sigilo dos dados coletados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Item de Pendência:

1. No cadastro da plataforma Brasil constavam 90 amostras, porém o projeto envolverá mais 25 amostras de tecido normal, totalizando 115 amostras.

Resposta: O número das amostras já foi corrigido no sistema da Plataforma Brasil e foi anexado nova Folha de Rosto com o número correto de Participantes.

Análise: Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

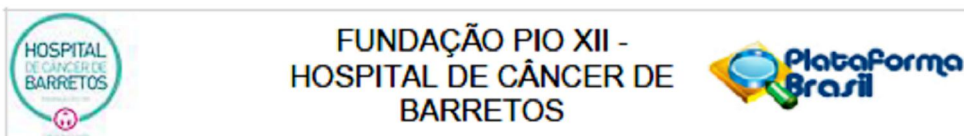
Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou a resposta as Pendências do projeto 770/2014, decidiu-se que o mesmo encontra-se APROVADO.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais (semestrais) para 14/09/2014.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-6600 Fax: (17)3321-6629 E-mail: cep@hncancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 557.543

circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

4. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

BARRETOS, 14 de Março de 2014

Assinador por:
José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-6600 Fax: (17)3321-6629 E-mail: cep@hncancerbarretos.com.br