

HOT TOPICS IN UROLOGIA



Analisi quantitativa della metilazione dei promotori dei geni BCL2, hTERT e DAPK nel sedimento urinario per la diagnosi del carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica: risultati di uno studio prospettico, bicentrico, di validazione

Gianluca Giannarini¹, Serena Vinci², Jitka Kuncova¹, Donata Villari³, Francesca Valent⁴, Claudio Orlando², Cesare Selli¹

¹Clinica Urologica, Dipartimento di Chirurgia, Università di Pisa, Pisa

²Unità di Biochimica Clinica, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università di Firenze, Firenze

³Clinica Urologica, Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica, Università di Firenze, Firenze

⁴Istituto di Epidemiologia, Università di Udine, Udine

Lo studio è stato finanziato in parte da un fondo del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (cod. 2006063214_002).

Riassunto:

Obiettivo: L'ipermetilazione dei promotori dei geni BCL2, hTERT and DAPK nelle urine è stata dimostrata un accurato biomarcatore per la diagnosi del carcinoma uroteliale della vescica in pazienti sottoposti a cistectomia radicale. Nel presente studio abbiamo indagato, con un intento di validazione, la frequenza e i livelli di metilazione degli stessi 3 geni nel tessuto tumorale e nel sedimento urinario di pazienti sottoposti a resezione transuretrale per carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica.

Metodi: Un totale di 108 pazienti consecutivi con carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica e di 105 controlli senza tumori del tratto urogenitale sono stati arruolati in questo studio prospettico condotto in due centri urologici universitari di riferimento dotati di un laboratorio di biologia molecolare avanzato. La frequenza e i livelli di metilazione dei promotori dei geni BCL2, hTERT e DAPK sono stati determinati con la *polymerase chain reaction* quantitativa metilazione-specifica in *real time* nel DNA estratto dal tessuto tumorale e dalla mucosa vescicale normale ottenuti durante la resezione transuretrale nei pazienti, e dalle urine raccolte sia dai pazienti che dai controlli.

Risultati: Nel tessuto tumorale almeno un gene ipermetilato è stato identificato nel 91% dei pazienti (BCL2 nel 62%, hTERT nel 53% e DAPK nel 48%). La metilazione di hTERT è risultata significativamente correlata con il grado tumorale ($p=0.026$). Nel sedimento urinario, la sensibilità e specificità del test sono risultate 76% e 98%, usando BCL2 e hTERT. Il numero dei geni metilati è risultato altamente correlato con il grado tumorale ($p=0.005$). I geni BCL2 e hTERT metilati nel sedimento urinario sono risultati altamente correlati con quelli metilati nel corrispondente tumore vescicale qualitativamente ($p<0.001$), e, solo per BCL2, anche quantitativamente ($p=0.005$). I livelli di metilazione di BCL2 e hTERT sono risultati variamente associati con il grado e lo stadio tumorale, ma significativamente correlati con l'età dei pazienti ($p=0.004$ e $p=0.027$, rispettivamente).

Conclusioni: I dati del presente studio suggeriscono che l'analisi quantitativa della metilazione urinaria di BCL2 e hTERT, ma non DAPK, può essere uno strumento utile nella diagnosi del carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica, meritevole di futuri studi di applicabilità clinica.

1. Introduzione

Il carcinoma uroteliale della vescica si manifesta più frequentemente ad uno stadio non muscolo-invasivo e ha un'alta tendenza a recidivare [1]. Il gold standard per la diagnosi è la cistoscopia, ma questa procedura è invasiva, costosa e associata a potenziali complicanze. La citologia urinaria viene usata da anni come alternativa alla cistoscopia, ma ha una bassa sensibilità, soprattutto nella diagnosi tumori di basso grado, ed è osservatore-dipendente. Per tale motivo, si rendono necessari test diagnostici che abbiano alta accuratezza e allo stesso tempo siano non invasivi ed economicamente efficienti, e questi includono nuovi test molecolari che analizzano il materiale genetico estratto dalle cellule tumorali esfoliate nelle urine [2].

Tra questi, un biomarcatore molto promettente recentemente studiato è la metilazione aberrante del DNA. Questo marcatore epigenetico possiede vantaggi teorici rispetto ai precedenti test genetici, poiché la metilazione è un evento frequente nelle cellule tumorali, così che solo alcuni loci richiedono l'analisi, e colpisce sempre le stesse regioni del DNA, richiedendo solo un'analisi limitata [3]. Quando un promotore genico è ipermetilato, il gene affiliato è silenziato. Questo silenziamento dei geni oncosoppressori è stato identificato nel carcinoma uroteliale della vescica con un'alta frequenza, suggerendo che diffuse le alterazioni del pattern di metilazione del DNA sono comuni e avvengono precocemente nella tumorigenesi vescicale [4]. Inoltre, questo biomarcatore dosato nelle urine è stato impiegato con successo per la diagnosi del carcinoma uroteliale della vescica [5].

La rilevanza clinica degli studi sulla metilazione è incrementata con l'introduzione di tecniche analitiche ad elevata sensibilità [6], quali la *polymerase chain reaction* quantitativa metilazione-specifica in *real time* (QMSP), che è stata usata anche per analizzare rari alleli ipermetilati presenti nei fluidi biologici. [7,8]. L'impiego di tecniche quantitative ha potenziali vantaggi sulle tradizionali analisi qualitative. Primo, la metilazione aberrante del DNA di alcuni geni avviene anche nell'epitelio non tumorale in condizioni fisiologiche e patologiche, e tende ad aumentare progressivamente con l'età [9-11]. In secondo luogo, i livelli di metilazione del DNA

possono essere associati allo stadio e al grado del tumore e alla sua progressione [12].

In un precedente e fondamentale studio sulla diagnosi del carcinoma uroteliale della vescica che ha indagato lo stato di metilazione di un gruppo di 12 geni associati all'apoptosi, la combinazione di BCL2, hTERT and DAPK è stata proposta come un accurato marcatore diagnostico [13]. L'analisi della metilazione urinaria era, tuttavia, limitata ad un piccolo gruppo di pazienti con carcinoma uroteliale della vescica sottoposti a cistectomia radicale. Al fine di validare l'utilità clinica della combinazione di un numero ristretto di geni quale potenziale biomarcatore per la diagnosi precoce del carcinoma uroteliale della vescica, abbiamo impiegato la QMSP per analizzare la metilazione aberrante degli stessi 3 geni sopra citati nel sedimento urinario di pazienti con carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica. Lo studio è stato condotto in uno scenario urologico routinario.

2. Materiali e metodi

2.1 Pazienti e campioni

Dopo approvazione del comitato etico locale, 108 pazienti consecutivi con carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica alla prima diagnosi, presentatisi presso le Cliniche Urologiche delle Università di Pisa e Firenze tra marzo 2006 e luglio 2007, sono stati arruolati in questo studio prospettico. Criteri di esclusione erano: tumori papillari della vescica con concomitante carcinoma in situ, un secondo tumore del tratto urogenitale precedente o concomitante, infezioni delle vie urinarie ricorrenti o concomitanti e litiasi urinaria. Centocinque soggetti con caratteristiche di età e sesso sovrapponibili ai pazienti e senza storia di carcinoma uroteliale della vescica o di altri tumori del tratto urogenitale sono stati reclutati nello studio come controlli affinché fornissero un campione di urine. Tra di essi abbiamo volutamente incluso più della metà di individui con condizioni mediche sintomatiche, quali ipertrofia prostatica benigna, infezioni delle vie urinarie e litiasi urinaria, che sono note per influire negativamente sulla specificità di numerosi test urinari per la diagnosi di carcinoma uroteliale della vescica disponibili sul mercato [14]. I restanti

controlli erano volontari sani impiegati come sanitari nei nostri ospedali. I soggetti sintomatici sono stati sottoposti a cistoscopia flessibile per escludere la presenza di tumore, mentre i volontari sono stati valutati con esame delle urine, citologia urinaria ed ecografia dell'apparato urinario,

risultati tutti negativi per il sospetto di un tumore vescicale. Sia i pazienti che i controlli hanno fornito un consenso informato scritto. Le loro caratteristiche demografiche sono riportate nella Tabella I.

Tabella I. Caratteristiche cliniche e patologiche dei soggetti arruolati.

Caratteristica		Pazienti	Controlli	p
Numero, n		108	105	
Età (anni), media±DS		67±12	64±13	0.58
Genere, n (%)	maschio	88 (81.5)	85 (80.9)	0.93
	femmina	20 (18.5)	20 (19.1)	
Abitudine al fumo, n (%)	fumatore/ex fumatore	73 (67.6)	62 (59.1)	0.12
	non fumatore	35 (32.4)	43 (40.9)	
Stadio tumorale, n (%)	Tis	2 (1.9)		
	Ta	86 (79.6)		
	T1	20 (18.5)		
Grado tumorale, n (%)	basso	65 (60.2)		
	alto	43 (39.8)		
Condizione medica, n (%)	ipertrofia prostatica benigna		29 (27.6)	
	infezione delle vie urinarie		17 (16.2)	
	litiasi urinaria		16 (15.2)	
	volontari sani		43 (41)	

DS, deviazione standard; Tis, carcinoma in situ

In 85 pazienti, durante la resezione transuretrale della vescica (TURB), sono stati raccolti un campione di tessuto tumorale e un campione di mucosa vescicale apparentemente normale, quest'ultimo mediante pinza "a freddo" e in duplicato, cioè una parte per l'esame istologico, che ha escluso malignità, e una parte per l'analisi della metilazione. I campioni di tessuto sono stati immediatamente immersi in RNA later (Qiagen, Hilden, Germania) e conservati secondo le istruzioni del fabbricante. La TURB è stata poi completata secondo la tecnica standard. L'esame

istologico è stato effettuato da un singolo patologo, che ha assegnato stadio e grado tumorale secondo la classificazione TNM della International Union Against Cancer del 2002 [15] e WHO del 2004 [16] (Tabella I).

Sia ai pazienti prima della TURB che ai controlli è stata raccolta una frazione (25-50 ml) di urina mattutina del mitto intermedio. I campioni sono stati centrifugati a 2000 giri al minuto per 10 minuti a 4°C, il supernatante è stato decantato, e il pellet è stato lavato due volte con PBS,

centrifugato a 5000 giri al minuto per 10 minuti a 4°C e conservato a -20°C.

2.2 Estrazione del DNA e esuo trattamento con sodio bisolfito

Il DNA è stato isolato dal tessuto tumorale, dalla mucosa vescicale normale e dal sedimento urinario mediante QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania) secondo le istruzioni del produttore. La concentrazione del DNA è stata determinata con lo spettrofotometro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Il DNA è stato conservato a -80°C. Come controllo positivo, 1 µg di DNA di sperma umano è stato metilato usando la DNA metilasi SssI (New England Biolabs, Ipswich, USA) e poi modificato con sodio bisolfito. DNA di sperma non trattato è stato usato come controllo negativo [17].

Per l'analisi della metilazione, 500 ng di DNA sono stati trattati con sodio bisolfito usando il Kit Epitect Bisulfite (Qiagen, Hilden, Germania), che converte i residui di citosina non metilata in residui di uracile. Il DNA così modificato è stato conservato a -20°C e usato entro 1 settimana.

2.3 Polymerase chain reaction quantitativa metilazione-specifica in real time (QMSP)

Le regioni ricche in CpG dei geni BCL2, hTERT and DAPK sono state analizzate mediante la QMSP, come descritto altrove [13]. La regione non contenente CpG della β-actina è stata usata come controllo per il ricupero del DNA dopo il trattamento con bisolfito. Il protocollo per la QMSP è stato condotto in duplicato in un volume di 12,5 µl che contenevano 1 µl di DNA modificato con bisolfito; sonda da 200nM; 6,25 µl di QuantiTect Probe polymerase chain reaction Master Mix 2x (Qiagen, Hilden, Germania), 600nM di primers e 2,25 µl di acqua. L'amplificazione è stata condotta con il seguente profilo: dopo 15 minuti a 95°C sono seguiti 50 cicli a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. Le reazioni di amplificazione sono state realizzate nel Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). In ogni analisi abbiamo incluso anche controlli positivi e negativi, DNA di sperma trattato o no con SssI e acqua. Il livello di metilazione del DNA dei vari geni è stato calcolato per ogni campione come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e poi moltiplicato per 1000 per una più agevole tabulazione.

2.4 Analisi statistica

Tutte le variabili continue sono risultate distribuite in modo normale secondo il test di Kolmogorov-Smirnov e vengono riportate come media ±

deviazione standard. Le variabili categoriche sono state confrontate con il test χ^2 e quelle continue con il test t di Student e l'analisi della varianza. L'analisi di regressione è stata condotta con il test di correlazione dei ranghi di Spearman. I livelli di metilazione dei 3 geni sono stati usati per costruire le curve receiver operating characteristic per la diagnosi di tumore vescicale. L'area sotto la curva (AUC) è stata calcolata mediante un modello logistico multivariato in cui i livelli quantitativi di metilazione in continuo sono stati considerati come variabili indipendenti. Il valore di significatività statistica è stato posto a 0.05. Tutte le analisi sono state condotte con il software SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Risultati

3.1 Metilazione nel tessuto tumorale e nella mucosa vescicale normale

L'analisi del tessuto tumorale ha rilevato che BCL2 era metilato in 53 pazienti, hTERT in 45 e DAPK in 41, con almeno un gene metilato in 77 campioni e una sensibilità globale del 91% (77/85). In 31, 35 e 11 pazienti, solo 1, 2 e tutti e 3 i geni, rispettivamente, sono risultati metilati. Una più alta frequenza di metilazione di hTERT è risultata significativamente associata a tumori ad alto grado ($p=0.026$) (Tabella II). La QMSP ha documentato i livelli di metilazione più alti per BCL2, seguito da hTERT e DAPK (Tabella III).

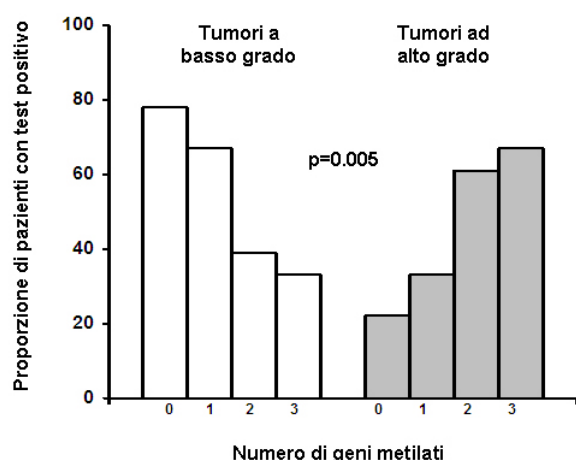
La metilazione del DNA è stata dosata a livelli molto bassi nella mucosa vescicale normale di 26 pazienti per BCL2 (9.1 ± 3.0), 10 per hTERT (6.7 ± 2.3) e 26 per DAPK (4.4 ± 0.9). Per BCL2 e hTERT, i livelli di metilazione nel tessuto tumorale sono risultati significativamente più alti che nella corrispondente mucosa vescicale normale ($p<0.001$ e $p=0.01$, rispettivamente), mentre questa differenza non è risultata statisticamente significativa per DAPK ($p=0.14$, dati non esibiti). La correlazione tra i livelli di metilazione nel tessuto tumorale e le caratteristiche cliniche e patologiche è descritta nella Tabella III.

3.2 Metilazione nel sedimento urinario

L'analisi del DNA estratto dal sedimento urinario ha permesso di identificare 70 pazienti con metilazione di BCL2, 45 con metilazione di hTERT and 27 con metilazione di DAPK, con almeno un gene metilato in 85 campioni e una sensibilità globale del 79% (85/108). Nei controlli, in 3 soggetti (2 con ipertrofia prostatica benigna e

1 volontario sano) è stata rilevata una metilazione molto debole di BCL2 (range 0.84 - 20.91, specificità del 97%), in una volontaria sana di hTERT (7.24, specificità del 99%) e in 10 soggetti (2 con ipertrofia prostatica benigna, 3 litiasi urinaria e 5 volontari sani) di DAPK (range 0.23 - 2.39, specificità del 90%). La AUC per il pannello dei 3 geni è risultata 0.81.

In 37, 39 e 9 pazienti, solo 1, 2 e tutti e 3 i geni, rispettivamente, sono risultati metilati. Il numero dei geni metilati è risultato significativamente correlato con il grado tumorale (p=0.005). Dei 23 pazienti con nessun gene metilato, 18 (78%) e 5 (22%) avevano tumori a basso e alto grado, rispettivamente. Analogamente, dei 9 pazienti con 3 geni metilati, 3 (33%) e 6 (67%) avevano tumori a basso e alto grado, rispettivamente (Figura 1).



sedimento urinario di pazienti con tumori ad alto grado (p=0.0001). Inoltre, la metilazione urinaria cumulativa dei 3 geni è risultata significativamente correlata con i tumori ad alto (90%) rispetto che a basso (71%) grado (p=0.038) (Tabella II).

La QMSP ha documentato un livello significativamente più alto di metilazione di BCL2 e hTERT nei tumori ad alto grado (p=0.001 e p=0.005, rispettivamente). La quantità di sequenze metilate di BCL2 ha mostrato un aumento progressivo passando da Ta a T1 (p=0.004). Questa correlazione non è stata documentata per hTERT, mentre DAPK ha mostrato una tendenza inversa (Tabella III).

Tabella III. Analisi quantitativa della metilazione genica nel tessuto tumorale e nel sedimento urinario (i livelli di metilazione sono riportati come media ± deviazione standard).

hTERT è risultato più frequentemente metilato nel

Tabella II. Frequenza della metilazione genica nel tessuto tumorale e nel sedimento urinario.

		Tessuto tumorale					Sedimento urinario						
		n=85		BCL2 n (%)	hTERT n (%)	DAPK n (%)	BCL2 + hTERT + DAPK n (%)	n=108		BCL2 n (%)	hTERT n (%)	DAPK n (%)	BCL2 + hTERT + DAPK n (%)
Pazienti	Genere,	maschio	n=70	45 (64)	40 (57)	35 (50)	65 (93)	maschio	n=88	64 (73)	42 (48)	23 (26)	76 (86)
	n (%)	fermina	n=15	8 (53)	5 (33)	6 (40)	12 (80)	fermina	n=20	6 (30)	3 (15)	4 (20)	9 (45)
										0.001	0.01		<0.001
	p												
Grado tumorale,	basso	n=50	31 (62)	21 (42)	22 (44)	45 (90)	basso	n=65	37 (57)	15 (23)	15 (23)	46 (71)	
	alto	n=35	22 (63)	24 (69)	19 (54)	32 (91)	alto	n=43	33 (37)	30 (70)	12 (28)	39 (91)	
	p										<0.001	0.038	
Stadio tumorale,	Tis	n=2	1 (50)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	Tis	n=2	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	
	Ta	n=70	46 (66)	37 (53)	33 (47)	65 (93)	Ta	n=86	57 (66)	33 (38)	23 (27)	68 (79)	
	T1	n=13	6 (46)	7 (54)	6 (46)	10 (77)	T1	n=20	13 (65)	11 (55)	4 (20)	16 (80)	
Controlli								n=105	3 (3)	1 (1)	10 (10)	11 (10)	

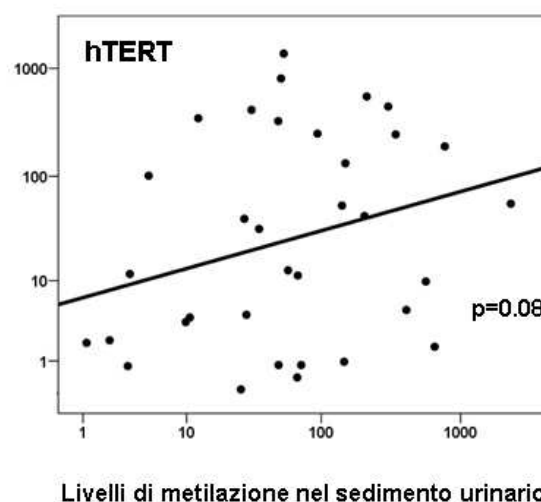
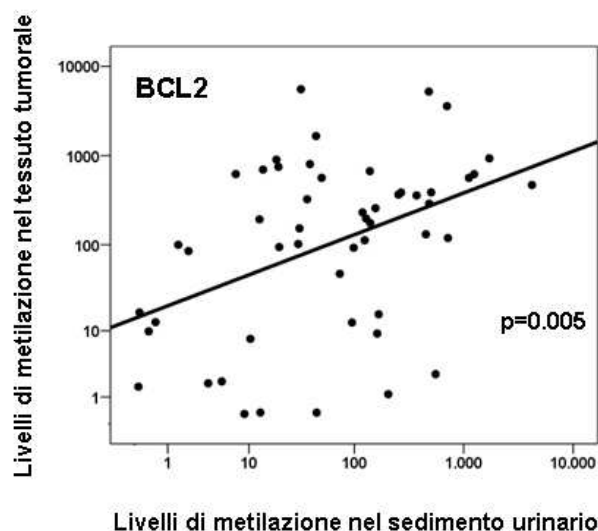
		Tessuto tumorale (n=85)			Sedimento urinario (n=108)		
		BCL2	hTERT	DAPK	BCL2	hTERT	DAPK
Genere	maschio	247±41	59±18	21±7	162±33	103±27	13±7
	femmina	253±117	41±25	10±9	26±11	91±29	2±1
<i>p</i>					0.001		
Grado tumorale	basso	231±53	36±16	22±8	51±9	28±10	10±7
	alto	274±57	77±28	21±10	266±59	145±37	12±10
<i>p</i>					0.001	0.005	
Stadio tumorale	Tis	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Ta	245±43	44±12	24±7	106±23	89±30	13±7
	T1	346±112	59±45	7±4	337±130	159±62	2±1
<i>p</i>					0.004		

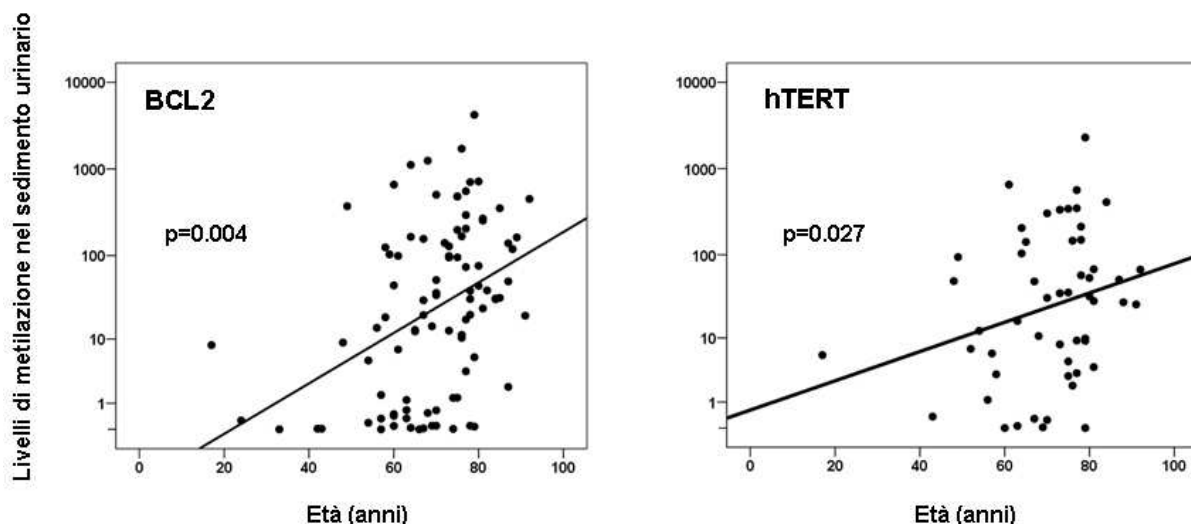
Tis, carcinoma in situ; NA non applicabile (solo 2 pazienti)

3.3 Correlazione tra la metilazione nel tessuto tumorale e nel sedimento urinario

Abbiamo rilevato un'alta concordanza tra la presenza simultanea di sequenze metilate di BCL2 e hTERT nel tessuto tumorale e nel sedimento urinario per gli stessi geni ($p < 0.001$ per entrambi). In dettaglio, tra i 53 pazienti positivi per BCL2 nel tumore, 43 (81%) sono risultati positivi anche nel sedimento urinario, così come 30 dei 45 pazienti (67%) con tumore positivo per hTERT. Al contrario, solo 13 di 41 pazienti (32%) avevano sia

il tumore che il sedimento urinario metilati per DAPK ($p=0.26$). Un profilo di metilazione discordante (positivo nel tumore e negativo nel sedimento urinario) è risultato significativamente correlato con lo stadio, ma non con il grado tumorale, per tutti e 3 i geni (dati non esibiti). Una correlazione quantitativa nei livelli di metilazione tra tessuto tumorale e sedimento urinario è stata solo in parte documentata. Infatti, mentre i livelli di metilazione di BCL2 nel sedimento urinario sono risultati altamente correlati con quelli ottenuti nel tessuto tumorale





($p=0.005$), questa tendenza è risultata meno evidente per hTERT, per il quale la relazione non ha raggiunto la significatività statistica ($p=0.08$) (Figura 2).

Nessuna correlazione significativa è stata documentata tra i livelli di metilazione di BCL2 e quelli di hTERT né nel tessuto tumorale né nel sedimento urinario (dati non esibiti).

3.4 Correlazione tra la metilazione urinaria e le caratteristiche dei pazienti

La frequenza di metilazione di BCL2 e hTERT è risultata significativamente più alta nei soggetti maschi rispetto alle femmine ($p=0.001$ e $p=0.01$, rispettivamente), così come la metilazione cumulativa dei 3 geni ($p<0.001$) (Tabella II). I livelli di metilazione urinaria di BCL2 e hTERT, ma non di DAPK, sono risultati altamente e positivamente correlati con l'età dei pazienti ($p=0.004$ e $p=0.027$, rispettivamente) (Figura 3).

Questa correlazione è risultata indipendente dal grado tumorale (dati non esibiti). La frequenza di metilazione non è risultata associata allo stato di fumatore o meno né nei pazienti né nei controlli ($p=0.53$).

4. Discussione e Conclusioni

Vi sono evidenze sempre maggiori in letteratura che la metilazione del DNA potrebbe rappresentare uno strumento fondamentale per la diagnosi precoce del tumore [18,19]. Ad oggi, numerosi gruppi hanno adottato questa strategia per diagnosticare il carcinoma uroteliale della vescica da un campione di urine, e un considerevole numero di geni è stato identificato con successo [2-4,13,20-29]. Tra i più importanti, oltre alla tripletta valutata nel presente studio, i geni RASSF1a, E-Cadherin, APC, EDNRB e TNFRSF25 sono stati

identificati con un'alta frequenza di metilazione nel carcinoma uroteliale della vescica da alcuni autori, che hanno anche dimostrato una loro correlazione con il grado e lo stadio tumorale, e il tasso di recidiva o di progressione [2-4,23,26]. Altri autori, invece, hanno documentato una bassa specificità di tali geni, giudicandoli di scarso interesse clinico [13,24]. Nonostante evidenti discrepanze, questi studi suggeriscono che un pannello di geni, piuttosto che un singolo biomarcatore, è necessario per migliorare la performance dei test diagnostici standard e per fornire informazioni clinicamente significative sul comportamento biologico del tumore. I ricercatori riconoscono, comunque, che anche aumentando il numero dei geni candidati all'analisi di metilazione, l'accuratezza diagnostica desiderata può non essere raggiunta, poiché in alcuni casi il carcinoma uroteliale della vescica non contiene alterazioni epigenetiche [2,24].

La combinazione della metilazione di BCL2, hTERT e DAPK è stata precedentemente studiata in un piccolo gruppo di 37 pazienti sottoposti a cistectomia radicale, presumibilmente per carcinoma uroteliale della vescica muscolo-invasivo o non muscolo-invasivo ad alto rischio, e in 20 volontari sani, e si è dimostrata la più utile dal punto di vista clinico in un gruppo di 12 geni oncosoppressori [13]. Al meglio delle nostre conoscenze, il presente studio è il primo ad aver validato esternamente l'utilità degli stessi 3 geni analizzati mediante la QMSP nel sedimento urinario di un numero consistente di pazienti sottoposti a TURB per carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica. Al fine di valutare la relazione tra sedimento urinario e tumore, il profilo di metilazione è stato anche studiato nel tessuto tumorale ottenuto durante la TURB dalla maggior parte dei pazienti.

Confermiamo che la metilazione è un evento frequente nel carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica: 92% dei campioni di

tumore contenevano almeno uno dei 3 geni metilati. BCL2 si è dimostrato il gene più frequentemente metilato nel tessuto tumorale, sebbene hTERT si sia rivelato l'unico ad avere una correlazione clinicamente significativa, esibendo un'elevata frequenza di metilazione nei tumori ad alto grado.

Nella mucosa vescicale normale si sono documentati livelli di metilazione bassi, ma ancora misurabili. Comunque, per BCL2 e hTERT, ma non per DAPK, i livelli di metilazione nel tessuto tumorale sono risultati significativamente più elevati di quelli nella mucosa vescicale normale. Questo dato enfatizza l'importanza di usare analisi quantitative negli studi di metilazione, ma suggerisce anche che la mucosa vescicale normale nei pazienti con carcinoma uroteliale della vescica ha già acquisito alcune trasformazioni epigenetiche che hanno promosso la crescita tumorale e che possono essere responsabili di un'eventuale recidiva.

Nel sedimento urinario, la sensibilità dei 3 geni è risultata del 79%, valore simile a quello riscontrato da Friedrich et al (78%) [13]. Considerando solo BCL2 e hTERT tale valore si è abbassato solo di poco (76%). La specificità dei 3 geni è risultata pari al 90%, raggiungendo il valore di 98% considerando solo BCL2 e hTERT.

I bassi livelli di metilazione di DAPK nel sedimento urinario sembrano confermare il limitato ruolo clinico di questo marcatore, come già evidenziato da Friedrich et al nei pazienti sottoposti a cistectomia radicale, i quali hanno mostrato questo gene metilato solo nel 21.6% dei casi [13]. Ciononostante, i nostri risultati differiscono da quelli dello studio sopra citato, che ha documentato una correlazione tra la metilazione di DAPK nel tessuto tumorale e nel sedimento urinario. Non abbiamo nessuna spiegazione molecolare per questa discrepanza.

Il numero dei geni metilati è risultato correlato con il grado tumorale, poiché i pazienti con tutti e 3 i geni metilati avevano prevalentemente tumori ad alto grado (67%). Viceversa, la maggior parte dei pazienti senza nessun gene metilato aveva tumori a basso grado (78%). La frequenza di metilazione di hTERT è risultata associata in modo più forte che quello degli altri due geni con le caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti, mostrando una correlazione significativa sia con il grado che con lo stadio tumorale.

L'analisi quantitativa del sedimento urinario ha documentato come i livelli di metilazione di BCL2 nei pazienti con tumori ad alto grado fossero di circa 6 volte superiori rispetto a quelli dei pazienti con tumori a basso grado. Tale differenza è risultata di circa 4 volte per hTERT. Inoltre abbiamo osservato un'associazione significativa tra

i livelli di metilazione di BCL2 e lo stadio tumorale, con concentrazioni progressivamente più alte passando da Ta a T1.

Un'altra domanda fondamentale è se la metilazione nel sedimento urinario possa riflettere lo stato di metilazione del corrispondente tumore vescicale. I nostri dati dimostrano che, almeno per BCL2, esiste una correlazione significativa tra le due misure, mentre questa correlazione lineare sembra essere meno evidente per hTERT.

Infine, i livelli di metilazione di BCL2 e hTERT nel sedimento urinario sono risultati significativamente correlati con l'età dei pazienti. Questo risultato conferma i dati di Yates et al [3] relativi ad un profilo epigenomico età-dipendente nel carcinoma uroteliale della vescica, fornendo ulteriori evidenze che l'accumulazione di geni ipermetilati può aumentare il rischio nel tempo di sviluppare neoplasie, anche della vescica [9-11]. Inoltre, sempre in accordo con Yates et al [3], non abbiamo dimostrato una correlazione significativa tra la frequenza di metilazione e l'abitudine o meno al fumo di sigaretta né nei pazienti né nei controlli.

Il costo dell'analisi di metilazione nel nostro laboratorio è di circa 7 Euro per gene e il tempo necessario per il referto definitivo è di circa 7 giorni.

Concediamo le seguenti limitazioni del nostro studio: 1) poiché la metilazione del DNA aumenta con l'età e si verifica anche nella mucosa vescicale normale, la sua relativa mancanza di specificità potrebbe essere superata impiegando un gruppo di geni più ampio. Riconosciamo che altri geni (sopra citati) sono stati identificati con successo e meriterebbero ulteriore considerazione, ma la nostra scelta di limitarci ad una tripletta di geni, oltre che con l'obiettivo di validare uno degli studi fondamentali in materia [13], è stata in gran parte dettata da motivi economici e praticità. Infatti, analizzare più marcatori non è una opzione realistica ed economicamente efficiente per un test routinario, poiché i costi aumenterebbero significativamente. Sebbene un'analisi formale di efficienza economica non sia stata effettuata, riteniamo il costo di 21 Euro (se tutti e 3 i geni venissero analizzati) ragionevole per un test diagnostico candidato ad essere introdotto nella pratica clinica. Infine, un elevato numero di marcatori aumenta la sensibilità del test, ma può diminuirne la specificità. 2) I risultati della citologia urinaria non erano disponibili per tutti i pazienti, quindi non è stato possibile confrontare l'accuratezza diagnostica dei marcatori di metilazione con l'attuale standard di riferimento. 3) Il presente test con biomarcatori ha il limite di rimanere confinato, almeno al presente, in centri che abbiano a disposizione una laboratorio di

biologia molecolare avanzato per la QMSP, poiché è stato dimostrato come i campioni di urina si deteriorino se vengono inviati al centro di riferimento da ospedali periferici [30]. 4) I dati sulla metilazione urinaria nel follow-up sono disponibili solo per 10 pazienti, quindi qualsiasi speculazione è prematura.

In conclusione, i dati del nostro studio suggeriscono che l'analisi quantitativa della metilazione urinaria dei geni BCL2 e hTERT, ma non DAPK, è uno strumento utile, non costoso e relativamente rapido per la diagnosi del carcinoma uroteliale non muscolo-invasivo della vescica. Studi prospettici e multicentrici sono necessari per validare l'applicabilità di questi marcatori nella gestione quotidiana dei pazienti con tumore vescicale, sia nella fase di screening che in quella di sorveglianza.

Bibliografia

- [1] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, Kaasinen E, Böhle A, Palou-Redorta J. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Eur Urol* 2008;54:303-14.
- [2] Roupert M, Hupertan V, Yates DR, et al. A comparison of the performance of microsatellite and methylation urine analysis for predicting the recurrence of urothelial cell carcinoma, and definition of a set of markers by Bayesian network analysis. *BJU Int* 2008;101:1448-53.
- [3] Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW. Methylation analysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls. *Oncogene* 2006;25:1984-8.
- [4] Dhawan D, Hamdy FC, Rehman I, et al. Evidence for the early onset of aberrant promoter methylation in urothelial carcinoma. *J Pathol* 2006;209:336-43.
- [5] Cairns P. Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead. *Nat Rev Cancer* 2007;7:531-43.
- [6] Brena RM, Huang TH, Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings. *J Mol Med* 2006;84:365-77.
- [7] Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2657-60.
- [8] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E32.
- [9] Toyota M, Issa JP. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer. *Semin Cancer Biol* 1999;9:349-57.
- [10] Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med* 2002;4:1-17.
- [11] Chan AO, Broaddus RR, Houlihan PS, Issa JP, Hamilton SR, Rashid A. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 2002;160:1823-30.
- [12] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.
- [13] Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, et al. Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients. *Clinical Cancer Res* 2004;10:7457-65.
- [14] Vrooman OP, Witjes JA. Urinary markers in bladder cancer. *Eur Urol* 2008;53:909-16.
- [15] Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors, 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002.
- [16] Sauter G, Algaba F, Amin M, et al. Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I, editors. WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARCC Press; 2004.
- [17] Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by MethyLight technology. *Methods* 2001;25:456-62.
- [18] Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2005;5:223-31.
- [19] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148-59.
- [20] Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res* 2001;61:8659-63.
- [21] Chan MW, Chan LW, Tang NL, et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:464-70.
- [22] Dulaimi E, Uzzo RG, Greenberg RE, Al-Saleem T, Cairns P. Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin Cancer Res* 2004;10:1887-93.