

Padrões de hipermetilação na displasia no contexto de Doença Inflamatória Intestinal (PhD²I²)

Coordenador científico/Investigador principal

Nome: Isadora Alexandra da Luz Rosa¹

Instituição: IPOLFG, EPE

Contacto email: isaalr9@aeiou.pt

Contacto telefone: +351914017192

Restantes investigadores envolvidos na recolha de dados e análise de amostras no IPOLFG, EPE
Catarina Fidalgo¹, Joana Moleiro¹, João Pereira da Silva¹, Patrícia Silva², Bruno Filipe², Cristina Albuquerque², Ricardo Fonseca³, Paula Borralho⁴, Paula Chaves³, António Dias Pereira¹

1- Serviço de Gastrenterologia, IPOLFG, EPE; 2- Serviço de Anatomia Patológica, IPOLFG, EPE;
3- Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular, IPOLFG, EPE; 4- Serviço de Anatomia Patológica, H CUF Descobertas

Promotor do estudo

Grupo de Estudos na Doença Inflamatória Intestinal (GEDII)

Resumo do projeto

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) com envolvimento cólico tem sido associada a um risco acrescido de carcinoma colo-rectal (CCR), apesar da clara magnitude deste risco estar ainda longe de ser consensual. As últimas recomendações de sociedades internacionais defendem estratégias de rastreio/vigilância de CCR que assentam na identificação precoce de displasia na mucosa colo-retal. No entanto, a concordância inter-observador na definição de displasia no contexto da DII está longe da ideal e a definição, gastrenterológica e anatomo-patológica, das diversas lesões elevadas com displasia tem ainda algum grau de subjetividade.

A carcinogénese colo-retal no contexto da DII tem características distintas, nomeadamente no que diz respeito à sequência de eventos e ao aparente defeito de campo e está ainda pouco caracterizada. Recentemente, surgiram dados que favorecem uma possível importância da metilação aberrante de ADN neste contexto.

O objetivo do presente estudo é caracterizar os padrões de metilação de diversos genes potencialmente envolvidos na carcinogénese colo-retal esporádica e/ou no contexto da DII, em doentes com displasia da mucosa colo-retal ou CCR identificados após um diagnóstico de DII.

Os doentes serão selecionados através do cruzamento da bases de dados de doentes com DII seguidos nos hospitais participantes (base do Grupo de Estudos em Doença Inflamatória Intestinal, GEDII) com as bases dos respetivos Serviços de Anatomia Patológica. Serão analisadas, a partir de blocos de parafina, amostras de mucosa com e sem displasia, para comparação dos padrões de metilação. A análise da hipermetilação do promotor dos genes em estudo será efetuada utilizando a técnica de MS-MLPA (*methylation-specific multiplex ligation-*

dependent probe amplification). Serão utilizados kits para análise da hipermetilação de genes previamente descritos como possivelmente contribuindo para discriminar o risco de CCR na DII [*RUNX3*, *CDH1* (codifica a E-caderina), *SOCS1*, receptor de estrogénios (*ESR*), *CDKN2A* (promotores P14-INK4-ARF e P16), *APC*, *SFRP1*, *MLH1*] e de outros genes que, pela sua função, poderão também estar envolvidos na carcinogénese associada à DII, nomeadamente *TGFβ*, *BMP* e genes da via Wnt.

A análise estatística será feita com o programa SPSS Statistics 19 (IBM). Serão utilizados os testes *t* de Student ou Wilcoxon, chi-quadrado ou teste Exact de Fisher e análise de regressão logística.

Objetivos e Fundamentação

A Doença Inflamatória Intestinal (DII), nomeadamente a colite ulcerosa (CU) e a doença de Crohn (DC) com envolvimento cólico, tem sido associada a um risco acrescido de carcinoma colo-rectal (CCR). Este aumento de risco foi estabelecido com base em vários estudos, incluindo duas meta-análises e, para a CU, calculava-se um risco cumulativo de CCR de 18% após 30 anos de doença⁽¹⁾. Apesar de estudos posteriores^(2,3) porem em causa esta magnitude de risco, as últimas recomendações de sociedades internacionais^(4,5) continuam a valorizar o problema do CCR no contexto da DII e a defender estratégias de rastreio/vigilância.

As atuais estratégias de rastreio/vigilância de CCR na DII assentam na identificação de displasia da mucosa, considerada quer uma alteração precursora, quer um sinal de alarme para a presença de CCR síncrono e/ ou para uma elevada probabilidade de CCR metacrónico. De facto, os dados disponíveis apontam para que os doentes com displasia de alto grau no contexto de DII possam ter CCR síncrono em 42% dos casos⁽⁶⁾ e, caso não sejam colectomizados, 32% deles poderão vir a desenvolver CCR. Já no que diz respeito à displasia de baixo grau, os dados são menos consistentes, mas o risco de CCR concomitante parece rondar os 20%⁽⁷⁾.

A classificação da displasia no contexto da DII assenta nas definições propostas por Riddell et al⁽⁸⁾ em 1983, mas a variabilidade interobservador encontrada em vários estudos, mesmo entre patologistas dedicados à gastroenterologia, levou à exigência de que qualquer diagnóstico de displasia neste contexto seja feito por dois patologistas⁽⁴⁾. Se esta dificuldade já existe para a displasia em mucosa plana, o quadro é ainda mais complexo no que diz respeito à displasia em lesões elevadas.

Recentemente, foram revistas as definições das lesões endoscopicamente visíveis em mucosa afetada pela colite, que passaram a ser divididas em: lesões *adenoma-like* e lesões *non-adenoma-like*⁹. As lesões *adenoma-like* são bem circunscritas (sésseis ou pediculadas), não necróticas e endoscopicamente removíveis – se forem excisadas com margem livre, sem displasia adjacente nem à distância, o doente deve permanecer sob vigilância endoscópica⁹. As lesões *non-adenoma-like* são áreas de placas/nódulos/elevações irregulares, espessamentos de aspeto verrucoso, retalhos aveludados na mucosa ou massas de base larga/mal definida e associam-se a um risco de CCRs síncronos e metacrónicos de 38-83% - a sua identificação justifica a realização de colectomia⁹. Finalmente, os adenomas convencionais que ocorrem em mucosa cólica não afetada pela DII devem ser manejados de forma idêntica à do seu manejo na população geral.

Uma vez que a classificação das lesões com displasia no contexto de DII é complexa e tem implicações terapêuticas *major*, seria ideal identificar alterações genéticas ou moleculares da mucosa características de cada tipo de lesão.

A carcinogénese colo-retal no contexto da DII parece ser distinta da carcinogénese esporádica. Embora as percentagens de tumores que apresentam instabilidade cromossómica *versus* os que apresentam instabilidade de microssatélites pareçam ser semelhantes (cerca de 85% e 15%, respetivamente)⁽⁷⁾, a sequência de alterações nos doentes com DII parece ser diferente da população em geral, em ambas as vias. Outra grande diferença na DII consiste na presença de um defeito de campo, possivelmente envolvendo todo o cólon afetado pela doença, identificado em vários estudos⁽¹⁰⁾. Assim, também a mucosa plana pode apresentar alterações passíveis de identificar precocemente e de contribuir para a estratificação do risco de CCR.

Nos últimos anos, tem-se tornado evidente a importância da metilação aberrante do ácido desoxirribonucleico (ADN) como mecanismo epigenético na carcinogénese, nomeadamente colo-retal. Embora os resultados de alguns estudos tenham sido contraditórios, este mecanismo parece poder ser também importante no contexto da DII^(11,12,13). Aliás, a própria inflamação crónica, através do stress oxidativo e da presença de diversas citocinas, parece poder induzir, para além de mutações pontuais, também metilação do ADN⁽¹⁴⁾, tendo como consequência a inativação de genes supressores de tumor, ativação de oncogenes e a promoção de instabilidade genética. A conjugação destes mecanismos desencadeia a tumorigénese, ligando assim a inflamação ao cancro.

O objetivo do presente estudo é, em todos os doentes seguidos nos hospitais participantes nos quais se identificou alguma forma de displasia e/ou carcinoma colo-rectal no contexto de DII, estudar os padrões de metilação de diversos genes propostos como envolvidos na carcinogénese colo-retal esporádica e/ou no contexto de DII. Serão analisados os padrões na mucosa com e sem displasia e, sempre que possível, na mucosa com e sem inflamação ativa e na mucosa afetada e não afetada pela DII. Assim, procuraremos identificar padrões característicos de cada tipo de lesão, que possam vir a ser testados em estudos prospetivos.

Material e métodos

Através do cruzamento das bases de dados de doentes com DII seguidos nos hospitais participantes (base do Grupo de Estudos em Doença Inflamatória Intestinal, GEDII) com as bases dos respetivos Serviços de Anatomia Patológica serão identificados os doentes com diagnóstico estabelecido de DII (definições recomendadas pela European Crohn and Colitis Organization (ECCO)^(15,16)) com atingimento do cólon e um diagnóstico posterior de displasia no cólon e/ou CCR. As definições de displasia e CCR serão feitas de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)⁽¹⁷⁾. As lesões macroscópicas identificadas serão classificadas de acordo com as recomendações da ECCO⁹.

Critérios de inclusão: diagnóstico de DII com atingimento do cólon; diagnóstico de displasia no cólon e/ou de CCR, pelo menos 12 meses depois do diagnóstico de DII; disponibilidade de amostras (em bloco de parafina) da área com displasia e/ou do CCR e de, pelo menos, uma área de mucosa cólica sem displasia; consentimento informado para participação no estudo.

Critérios de exclusão: história pessoal de CCR prévio ao diagnóstico de DII; história familiar de síndrome hereditário com risco aumentado de CCR.

Serão avaliados o sexo e idade dos doentes, datas de diagnóstico de DII e de displasia e/ou CCR, cirurgias prévias, terapêutica médica instituída previamente e à data do diagnóstico de

displasia/CCR, atitude terapêutica e/ou de vigilância após o diagnóstico e existência de diagnósticos posteriores de displasia e/ou CCR.

Todos os diagnósticos anatomo-patológicos serão confirmados por dois patologistas diferenciados na área da gastroenterologia e serão selecionadas para análise, em cada doente, amostras em blocos de parafina de: mucosa com displasia ou CCR (amostra A); mucosa plana sem displasia a menos de 10cm da área displásica (amostra B); mucosa plana sem displasia a mais de 10cm da área displásica, atingida pela DII, mas sem inflamação ativa (amostra C); mucosa plana sem displasia a mais de 10cm da área displásica, atingida pela DII, com inflamação ativa (amostra D); mucosa plana sem displasia a mais de 10cm da área displásica e não atingida pela DII (amostra E). Para inclusão no estudo, cada doente terá de ter disponíveis para análise, pelo menos, a amostra A e, pelo menos, uma de entre as amostras B, C ou D. Todas as amostras têm de ter sido colhidas até 3 meses antes ou depois da colheita da amostra A. Em cada uma das amostras disponíveis será feita análise dos padrões de hipermetilação do ADN.

A análise da hipermetilação do promotor dos genes em estudo será efetuada utilizando a técnica de MS-MLPA⁽¹⁸⁾ (*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*), baseada no reconhecimento, efetuado por sondas específicas para cada gene, de sequências de ADN que contêm um local de restrição para a enzima HhaI, o qual é sensível à metilação. A HhaI hidrolisa o ADN não metilado nas sequências GCGC, mas deixa os locais metilados intactos, originando um sinal de amplificação no caso do ADN não ser hidrolisado.

Os reagentes de MS-MLPA serão obtidos da MRC-Holland® (SALSA MLPA KITS ME042-B1 CIMP; ME002-B1 Tumor Sup 2; ME001-C1 Tumor Sup 1; ME004-A1 Tumor Sup 4). Estes kits permitirão a análise da hipermetilação de genes previamente descritos como possivelmente contribuindo para discriminar o risco de CCR na DII [*RUNX3*, *CDH1* (codifica a E-caderina), *SOCS1*, recetor de estrogénios (*ESR*), *CDKN2A* (promotores P14-INK4-ARF e P16), *APC*, *SFRP1*, *MLH1*]. Adicionalmente, estes kits permitirão a análise de outros genes que, pela sua função, poderão também estar envolvidos na carcinogénese associada à DII, nomeadamente genes envolvidos na apoptose, ciclo celular, adesão celular, reparação do ADN e em vias de sinalização conhecidas, nomeadamente *TGFβ*, *BMP* e genes da via Wnt. A análise da hipermetilação do promotor dos genes *MCC* e *PTGS2* (*Cox-2*) será efetuada utilizando sondas sintéticas desenhadas para estes genes, os reagentes de MS-MLPA e as sondas P200 *Human DNA reference-1*.

A técnica de MS-MLPA será efetuada de acordo com o descrito pelo fabricante. Brevemente, 50-200 ng de ADN serão desnaturados e subsequentemente deixados atingir 25°C. Após adicionar a mistura de sondas, a amostra de ADN será desnaturada e irá decorrer a hibridação das sondas a 60°C durante 16h. Subsequentemente, metade da amostra será utilizada numa reação de ligação, enquanto na outra metade, a reação de ligação será combinada com uma reação de hidrólise pela enzima HhaI, resultando na ligação apenas das sequências metiladas (30 min a 49°C). A reação de PCR será efetuada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando 5µl da reação de ligação. A eficiência do MS-MLPA será controlada por eletroforese em gel de agarose. De seguida, os produtos do PCR serão separados por eletroforese em capilar (ABI 310, *Applied Biosystems*) e analisados utilizando o *software* GeneScan (*Applied Biosystems*®). A análise dos resultados de MS-MLPA será efetuada através do *software* Coffalyser 9.0 (*MRC-Holland*®), de acordo com as instruções do mesmo. Será calculada uma razão de dosagem a partir das áreas dos picos de todas as sondas controlo, na

amostra hidrolizada pela Hhal, relativamente à amostra não hidrolizada⁽¹⁸⁻²²⁾. Uma razão igual ou superior a 0,15, corresponde a 15% de metilação e será interpretada como indicativa de metilação do promotor⁽²²⁾.

Considerações éticas

Todos os doentes forneceram consentimento informado para as cirurgias e colonoscopias realizadas, de acordo com os procedimentos em vigor nos respetivos hospitais.

O estudo será submetido a apreciação pelas Comissões de Ética de todos os hospitais participantes e a investigação será feita de acordo com a Declaração de Helsínquia.

Todos os dados recolhidos estão sujeitos a confidencialidade e será garantido o anonimato dos doentes na análise e publicação dos dados.

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, que não prevê qualquer intervenção sobre os doentes e requer apenas: dados demográficos e clínicos obtidos pelos investigadores de cada centro a partir da base de dados do GEDII e/ou do processo clínico e enviados para a investigadora nuclear sem identificação do doente; a análise de lâminas e blocos de parafina previamente recolhidos, sem identificação do doente. Será pedido consentimento informado, oral e por escrito (Anexo I), a cada doente, para utilização das lâminas e blocos de parafina em arquivo.

Os resultados deste estudo podem permitir definir padrões de hipermetilação característicos de cada tipo de lesão que, se validados em estudos prospetivos, poderão resultar uma alteração nas estratégias de vigilância e terapêutica das lesões displásicas encontradas em doentes com DII.

Gestão de dados e arquivo

Toda a informação será recolhida pelos investigadores do estudo e registada nos formulários (Anexo II), que terão de estar preenchidos na totalidade para cada indivíduo incluído na análise.

Os dados obtidos serão registados num ficheiro informático pessoal, protegido, da investigadora nuclear do estudo.

Plano de análise estatística

Para obter um nível de confiança de 95%, com um poder de estudo de 80%, com um rácio de 2:1 de controlos/casos, serão necessários 108 doentes (72 controlos e 36 casos) para identificar diferenças de prevalência de metilação iguais ou superiores a 30%.

Serão considerados controlos os doentes com: adenomas ou CCR em mucosa nunca afetada pela DII; adenomas em mucosa afetada pela DII, mas sem inflamação ativa e definidos endoscopicamente como lesões *adenoma-like*, sem displasia adjacente, nem noutra localização no cólon. Serão considerados casos os doentes com: displasia ou CCR em mucosa plana, ou multifocal; lesões definidas endoscopicamente como *non-adenoma-like*.

A análise estatística será feita com o programa SPSS Statistics 19 (IBM).

As variáveis contínuas serão expressas como médias e desvios-padrão e comparadas pelos testes *t* de Student ou Wilcoxon. As variáveis qualitativas serão expressas como frequências absolutas e/ou relativas e correlacionadas pelos testes chi-quadrado ou teste Exact de Fisher. Para correlacionar múltiplas variáveis, será feita análise de regressão logística.

Todas as alterações à análise planeada serão documentadas, reportadas e justificadas na apresentação final dos resultados.

Calendarização prevista

3 meses: Submissão do projeto, para aprovação, aos Serviços e Comissões de Ética dos hospitais participantes.

3 meses: Análise das bases de dados para seleção dos doentes, seguida do envio dos dados, lâminas e blocos de parafina para o IPOLFG, EPE, para revisão pelos patologistas envolvidos no estudo, com seleção das amostras para análise e envio das amostras dos blocos de parafina para análise.

12 meses: Análise dos padrões de metilação nas amostras selecionadas.

3 meses: Análise, discussão e apresentação de resultados.

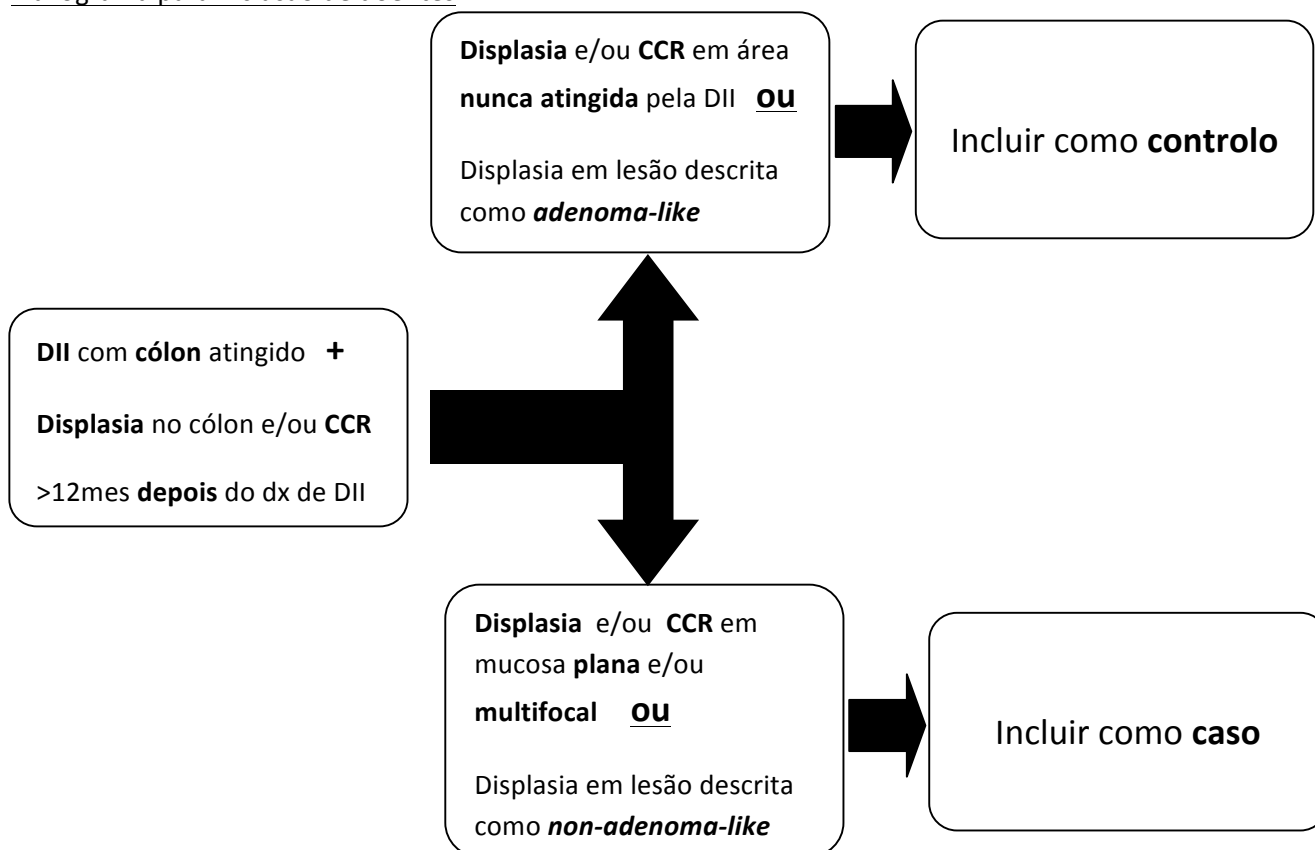
Crítérios de autoria

Para além dos investigadores envolvidos na recolha de dados, análise de amostras no IPOLFG e na análise e interpretação de dados, serão coautores do trabalho o GEDII e os investigadores que incluírem doentes no estudo (gastroenterologistas e/ou anatomo-patologistas, a definir por cada centro), por ordem do número de doentes incluídos. O número de autores a incluir abaixo do título poderá ser condicionado pelos critérios da revista científica em que o estudo vier a ser publicado (a definir), surgindo os restantes na secção «outros autores».

Financiamento

O projeto será financiado na íntegra por uma bolsa do GEDII.

Fluxograma para inclusão de doentes



Bibliografía

1. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48:526–35.
2. Winther KV, Jess T, Langholz E et al. Longterm risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2004;2:1088–95.
3. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, et al. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006;130:1030–8.
4. L Biancone, P Michetti, S Travis et al. European evidence-based Consensus on the management of ulcerative colitis: Special situations. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008; 2 : 63–92.
5. Itzkowitz SH, Present DH et al. Consensus conference: colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005; 3: 314-321.
6. Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein CB et al. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? *Lancet* 1994; 343: 71-74.
7. Harpaz N, Polydorides AD. Colorectal dysplasia in chronic inflammatory bowel disease. Pathology, clinical implications, and pathogenesis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2010; 134: 876-895.
8. Riddel RH, Goldman H, Ransohoff DF et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Human Pathology* 1983; 14: 931-968.
9. Van Assche G, Dignass A, Bokemeyer B et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Special situations. *Journal of Crohn's and Colitis* 2013; 7(1): 1-33.
10. Galandiuk S, Justo MR, Jeffery R et al. Field cancerization in the intestinal epithelium of patients with Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 2012; 142: 855-864.
11. Park MMG, Loftus EV, Sandborn WJ et al. Methylation status of genes in non-neoplastic mucosa from patients with ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *The American Journal of Gastroenterology* 2010. 105: 1610-1619.
12. Azuara D, Moranta FR, Oca J et al. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012; E-pub ahead of print.
13. Olaru AV, Cheng Y, Agarwal R et al. Unique patterns of CpG Island methylation in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012; 18: 641-648.
14. Hartnett L, Egan LJ. Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33: 723-731.
15. Van Assche G, Dignass A, Panes J et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2010; 4: 7–27.
16. Stange EF, Travis SPL, Vermeire S et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis* 2008; 2: 1–23.
17. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA, editors. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and*

genetics of tumours of the digestive system. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press 2000; 103-119.

18. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research* 2005; 33: e128.

19. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 2002; 30: e57.

20. Joensuu EI, Abdel-Rahman WM, Ollikainen M et al. Epigenetic signatures of familial cancer are characteristic of tumor type and family category. *Cancer Research* 2008; 68: 4597-605.

21. Gylling A, Ridanpaa M, Vierimaa O et al. Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome. *International Journal of Cancer* 2009; 124: 2333-40.

22. Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M et al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007; 56: 926-33.