



**UNIVERSIDADE ESTADUAL JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**O PAPEL DA PROTEÍNA TET2 NO ENRIQUECIMENTO DO DNA GENÔMICO EM 5-
HIDROXIMETILCITOSINA EM LESÕES MELANOCÍTICAS PRÉ-MALIGNAS E PRÉ-METASTÁTICAS COM
FENÓTIPO STEM CELL-LIKE**

GUILHERME BURGARELLI LEITE

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas

BOTUCATU-SP

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL JULIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU**

**O PAPEL DA PROTEÍNA TET2 NO ENRIQUECIMENTO DO DNA GENÔMICO EM 5-
HIDROXIMETILCITOSINA EM LESÕES MELANOCÍTICAS PRÉ-MALIGNAS E PRÉ-METASTÁTICAS COM
FENÓTIPO STEM CELL-LIKE**

GUILHERME BURGARELLI LEITE

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

Co-orientadora: Dra. Camila Ferreira de Souza

Supervisora: Profa. Dra. Claudia Aparecida Rainho

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas

BOTUCATU – SP

2013

RESUMO

Durante a transformação maligna dos melanócitos, padrões de metilação do DNA encontram-se alterados, afetando a expressão gênica. As citosinas metiladas (5mC) podem ser hidroxiladas pelas dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato e Fe(II), Tet1, 2 e 3, resultando na formação de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (Globisch *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2010). A 5hmC pode agir tanto como um produto intermediário na desmetilação ativa do DNA quanto na desmetilação passiva ao longo de sucessivas replicações, o que pode contribuir com a dinâmica da metilação do DNA (Tahiliani *et al.*, 2009). Além disso, demonstrou-se que Tet1 e Tet2 são expressas em células tronco embrionárias (Ito *et al.*, 2010) e que 5hmC desempenha importante papel na manutenção e diferenciação destas células (Koh *et al.*, 2011). No entanto, o papel da 5hmC e das proteínas Tet tanto na fisiologia normal quanto em doenças como o câncer ainda não está claro.

Utilizando um modelo linear de progressão do melanoma, observamos aumento na expressão gênica de *Tet1* nas linhagens celulares correspondendo a melanócitos pré-malignos (4C) e células de melanoma não metastático (4C11-), comparado a melanócitos não tumorigênicos (melan-a) e células de melanoma metastático (4C11+). Em relação à expressão proteica, há um aumento da expressão de Tet1 nas linhagens 4C e 4C11+, o que pode ser relacionado às fases de transição epitélio-mesênquima (EMT) e mesênquima-epitélio (MET), respectivamente.

Além disso, constatamos aumento na expressão gênica e proteica de Tet2 na linhagem metastática 4C11+, o que pode indicar diferenças funcionais entre as proteínas Tet1 e Tet2. Também verificamos aumento significativo do conteúdo de 5hmC na linhagem 4C11+, o que se correlaciona com maior expressão gênica e proteica de Tet2.

Por fim, linhagens humanas de melanoma metastático menos agressivas apresentaram aumento significativo na expressão dos genes *TET1* e *TET2*, em comparação a linhagens mais agressivas.

Estudos posteriores deverão ser realizados para avaliar as funções de Tet1 e Tet2, e de 5hmC como importantes alterações moleculares potencialmente envolvidas na progressão tumoral.

INTRODUÇÃO

Melanoma

Melanócitos são células da pele produtoras de melanina, originados de células precursoras da crista neural que migram, proliferam e se diferenciam até chegarem em seus destinos na camada basal da epiderme, folículos pilosos, coróide e leptomeninges, em humanos (Lin & Fisher, 2007). Na camada basal da epiderme, os melanócitos são circundados e interagem com queratinócitos, que controlam sua proliferação. Estas interações, quando alteradas, provocam proliferação excessiva de melanócitos, podendo contribuir com o desenvolvimento do melanoma cutâneo (Haass *et al.*, 2005).

A progressão do melanoma pode ser classificada em fases fenotípicas e clínicas distintas: primeiramente, melanócitos normais perdem o controle dos queratinócitos que os cercam, proliferando e formando nevos benignos. Nevos estruturalmente atípicos podem em seguida progredir para melanoma primário em fase de crescimento radial (RGP), possuindo algumas células com capacidade de invadir a derme, mas não de proliferar neste local. A fase de crescimento vertical (VGP) caracteriza-se pela presença de células com potencial de invadir a derme. Por último, pode haver a progressão para melanoma metastático, com a dissociação de agregados de células do tumor primário para outras regiões da pele e/ou tecidos distantes (Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Perlis & Herlyn, 2004) (**Figura 1**).

Os tratamentos mais comuns para melanoma metastático apresentam pouca eficácia, uma vez que estes tumores são radio e quimiorresistentes (Satyamoorthy & Herlyn, 2002). A heterogeneidade molecular, aliada à capacidade de metastatizar para qualquer órgão do corpo, configura a principal barreira para o controle clínico do melanoma metastático (Noughton & Polsky, 2002; Vidwans *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012a; Somasundaram *et al.*, 2012).

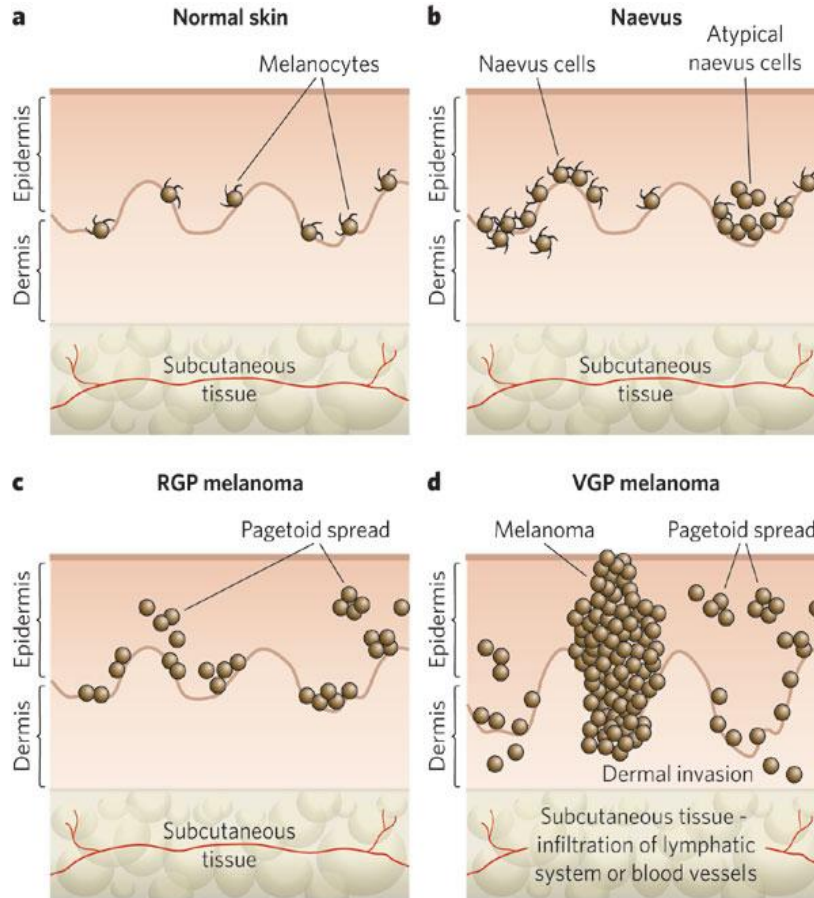


Figura 1. Progressão do melanoma. Há vários estágios de lesão melanocítica, sendo cada um marcado pela presença de um novo clone de células com vantagens de crescimento sobre os tecidos circundantes. **A.** Pele humana normal, evidenciando a distribuição uniforme dos melanócitos dendríticos na camada basal da epiderme. **B.** Nevos benignos nos estágios iniciais, caracterizados pela proliferação dos melanócitos (lesão melanocítica hiperplásica). De acordo com a sua localização, os nevos podem ser denominados juncional (proliferação de melanócitos restrita à epiderme), dérmico (presença de melanócitos na derme) ou composto (melanócitos na epiderme e derme). Alguns nevos apresentam melanócitos morfologicamente atípicos (lesão pré-maligna). **C.** Melanoma primário RGP, com crescimento “in situ” restrito à epiderme, estando associado com um prognóstico bom. **D.** Melanoma primário VGP, com invasão da membrana basal e presença de células de melanoma na derme, estando associado com um prognóstico ruim, uma vez que melanomas VGP podem progredir para o melanoma metastático, caracterizado por extenso aumento da vascularização, infiltração vascular vias hematogênica e linfática, e colonização em tecidos distantes. O termo ‘espraiamento pagetóide’ (*pagetoid spread*) descreve a migração ascendente dos melanócitos isolados ou em pequenos grupos na epiderme ou o “empilhamento vertical” dos melanócitos que, juntamente com atipias celulares marcantes, é uma característica histológica de melanomas (modificado de Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Epigenética e câncer

Epigenética é o estudo de alterações hereditárias na expressão gênica que ocorrem sem que existam alterações na sequência primária do DNA (Kulis & Esteller, 2010) e incluem os mecanismos de metilação do DNA, modificações nas caudas N-terminais das proteínas

histonas, incorporação de histonas variantes nos nucleossomos, remodelamento de nucleossomos e RNAs não codificantes (Sharma *et al.*, 2010). A metilação do DNA é o evento mais estudado, sendo catalisada por enzimas específicas, as DNA metiltransferases (DNMTs). Apesar de não serem exclusivas, geralmente DNMT3a e 3b são responsáveis pela metilação *de novo*, enquanto DNMT1 promove a manutenção da metilação durante a replicação do DNA (Hermann *et al.*, 2004). Citosinas que precedem uma guanina (dinucleotídeos CpG) são, em mamíferos, sítios potenciais de modificação pelas DNMTs. Estas enzimas catalisam a transferência de um grupo metila da S-adenosilmetionina para o carbono 5 do anel da citosina, resultando em 5-metilcitosina (5mC), considerada a quinta base do DNA (Hermann & Baylin, 2003). Além da 5-metilcitosina, outras marcas no DNA já foram descritas, como 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC), formadas por oxidação sequencial catalisada por proteínas da família Tet (Wu & Zhang, 2011).

Dinucleotídeos CpG concentram-se em regiões denominadas ilhas CpG, situadas principalmente em regiões promotoras e no primeiro éxon de genes (Kulis & Esteller, 2010). Em células normais, aproximadamente 70% dos CpGs estão metilados (Brena & Costello, 2007), sendo a maioria dos não metilados presentes nas ilhas CpG (Cedar & Bergman 2009). O câncer caracteriza-se por hipometilação global e hipermetilação específica de ilhas CpG em regiões promotoras de genes (Jones & Baylin, 2002). A hipometilação favorece instabilidade genômica e ativação de oncogenes, enquanto a hipermetilação em promotores de genes supressores de tumor (TSGs) leva ao silenciamento destes genes (Sharma *et al.*, 2010). A hipometilação de regiões gênicas pode contribuir para a tumorigênese, afetando oncogenes clássicos, mas evidências sugerem um envolvimento maior da ativação de genes associados com invasão tumoral e metástase (Ehrlich, 2009).

A metilação normal do DNA ocorre em regiões centroméricas e teloméricas, durante a inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, em genes que sofrem *imprinting* e em sequências repetitivas de DNA (Baylin & Jones, 2011). Assim, ilhas CpG em promotores encontram-se normalmente não metiladas na eucromatina, mas apresentam nível elevado de metilação na heterocromatina (Schinke *et al.*, 2010). Além disso, durante o desenvolvimento de mamíferos há uma reprogramação genômica completa nas células germinativas e durante a fase de pré-implantação embrionária, caracterizada por desmetilação quase completa do DNA, que resulta no apagamento da informação epigenética existente (Hermann *et al.*, 2004). Durante a transformação maligna, a metilação de ilhas CpG é alterada, afetando a expressão de genes codificadores de proteínas e também a expressão de vários RNAs não codificantes (Baylin & Jones, 2011).

Um evento primário na progressão do câncer é caracterizado por uma modificação que ocorre independentemente, e não como consequência de uma alteração oncogênica primária, e que pode ser herdado, contribuindo para a malignidade. O evento clonal primário pode ser genético ou epigenético (Bennett, 2007). Até o momento foram identificados mais de 70 genes hipermetilados durante a progressão do melanoma, alguns deles responsáveis pelo fenótipo maligno (Schinke *et al.*, 2010), levando às modificações mais comuns do melanoma: evasão de mecanismos apoptóticos, transição epitélio-mesênquima (EMT) e superação de barreiras de senescência (Bennett, 2007). Além disso, uma forte evidência do envolvimento de mecanismos epigenéticos na progressão de lesões melanocíticas é a relação entre exposição constante à radiação ultravioleta (UV) e o desenvolvimento de alguns subtipos de melanomas (Tucker & Goldstein, 2003; Curtin *et al.*, 2005).

5-hidroximetilcitosina e proteínas Tet

Proteínas Tet (1-3) são dioxigenases dependentes de 2-oxoglutarato (2OG) e Fe(II) que catalisam a hidroxilação de 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) no DNA (Tahiliani *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2011). Elas podem influenciar a regulação de transcrição de genes a curto e longo prazos (Dahl *et al.*, 2011) a partir da manutenção de estados não metilados em regiões promotoras de genes, apresentando forte ligação a ilhas CpG (Guo *et al.*, 2011). A presença de 5hmC interfere na ligação de proteínas de ligação a CpG metilado (MBPs) ao DNA, podendo prevenir a sequência da repressão epigenética que ocorre por modificação em histonas e reestruturação da cromatina (Frauer *et al.*, 2011).

Uma das funções propostas para 5hmC é a de participar do processo de desmetilação do DNA, que pode ocorrer de forma passiva, pois a DNMT1 não reconhece muito bem 5hmCs, resultando na diminuição da metilação de CpGs ao longo de ciclos sucessivos de replicação do DNA, e também como intermediária no processo ativo de desmetilação de DNA, sendo incluídas as formas oxidadas 5fC e 5caC (**Figura 2**) (Tahiliani *et al.*, 2009; Wu & Zhang, 2011). Além disso, há uma forte associação entre Tet1, Tet2 e 5hmC e estados de pluripotência em células-tronco embrionárias (ES) e pluripotente induzidas (iPS), em contraste com Tet3, que está associada a um estado de diferenciação celular (Koh *et al.*, 2011). Em células-tronco embrionárias em diferenciação, Tet1 e Tet2 parecem controlar grupos distintos de genes que atuam em etapas iniciais da diferenciação celular e afetar diferentes vias de sinalização. Enquanto a depleção de Tet1 leva ao comprometimento com a linhagem trofoblástica, a depleção de Tet2 promove diferenciação neuroectodérmica (Walter, 2011). Estudos recentes

observaram que melanócitos e nevos benignos apresentam níveis elevados de 5hmC, enquanto perdas parciais ou totais de 5hmC foram caracterizadas em melanomas primários e metastáticos. Estes dados indicam que a perda de 5hmC é um evento genômico global durante a progressão do melanoma e uma marca epigenética importante (Lian *et al.*, 2012). Assim, alterações em 5hmC e proteínas Tet podem ser biomarcadores úteis para predição de risco, diagnóstico e prognóstico, além de possível alvo terapêutico no melanoma.

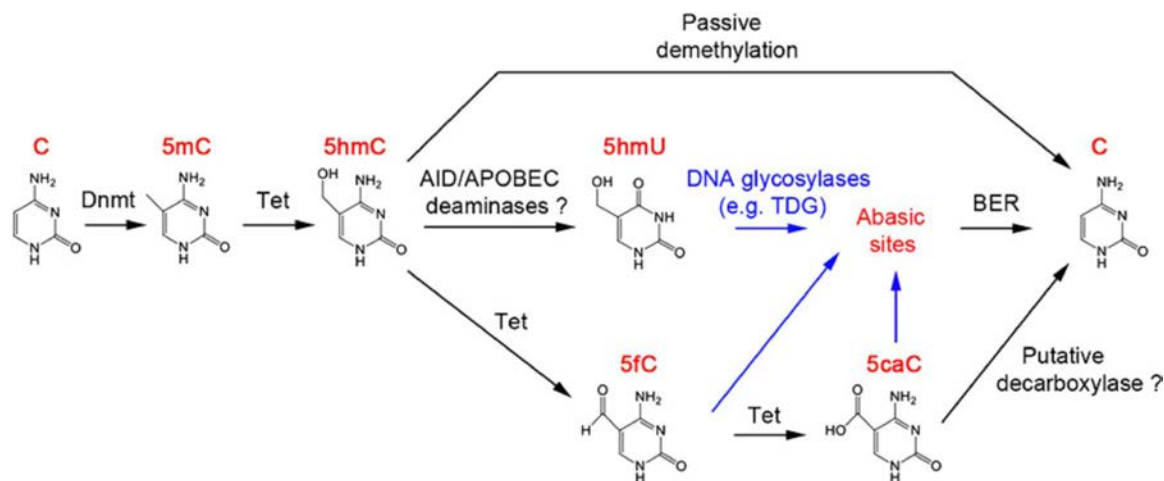


Figura 2. Modelos propostos para as vias de desmetilação do DNA iniciadas por Tet. Metilação de DNA (5mC) determinada por DNMTs. 5mC pode ser hidroxilada por proteínas da família Tet e gerar 5hmC. O não reconhecimento de 5hmC por DNMT1 pode levar à desmetilação passiva durante a replicação. 5hmC pode ser oxidada sequencialmente por proteínas Tet e produzir 5fC e 5caC. Alternativamente, 5hmC pode sofrer ação de deaminases de citidina AID (*activation induced deaminase*)/APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme complex*), resultando em 5-hidroximetiluracila (5hmU). 5hmU, 5fC e 5caC podem ser excisadas do DNA por glicosilases como TDG (*Thymine-DNA glycosylase*). Uma decarboxilase pode converter diretamente 5caC em citosina (C) (Wu & Zhang, 2011).

Modelo de progressão de melanoma associado a estresse sustentado

O modelo murino *in vitro* utilizado destaca-se por empregar o bloqueio de adesão ao substrato como fator de transformação melanocítica e não utilizar carcinógenos ou manipulação genética (Oba-Shinjo *et al.*, 2006). Neste modelo de progressão linear do melanoma, a linhagem murina imortalizada, porém não-tumorigênica de melanócitos, melan-a (Bennett *et al.*, 1987), foi submetida a ciclos de impedimento de ancoragem, resultando em linhagens apresentando alterações morfológicas e expressão diferenciada de moléculas (Oba-Shinjo *et al.*, 2006; Ricca *et al.*, 2009; Molognoni *et al.*, 2011).

Inicialmente, os melanócitos melan-a foram submetidos a um ciclo de bloqueio de adesão por 96 horas, apresentando esferoides de células resistentes ao *anoikis*. Os esferoides

foram cultivados então em condições de adesão e originaram a linhagem 1C, submetida a novos ciclos de impedimento de ancoragem. Células submetidas a 2, 3 e 4 ciclos de desadesão foram denominadas 2C, 3C e 4C, respectivamente. Após submeter a linhagem pré-maligna 4C a mais um ciclo de desadesão, os esferoides obtidos foram submetidos à diluição limitante, originando diferentes linhagens tumorais não metastáticas (4C3- e 4C11-, por exemplo) e metastáticas (4C3+, 4C11+, Tm1, Tm5, e outras), apresentando crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade *in vivo* (Oba-Shinjo *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2012b) (**Figura 3**). A aquisição do fenótipo metastático observado na linhagem de melanoma 4C11+ foi marcada pela alteração de pelo menos 16 vias de sinalização em relação a sua contraparte celular não metastática (linhagem 4C11-) (Souza *et al.*, 2012b). Como exemplo, podemos destacar a perda da proteína TP53 nas linhagens metastáticas (4C3+ e 4C11+) quando comparadas às linhagens não metastáticas (4C3- e 4C11-) (Molognoni & Jasiulionis, 2011).

Esse modelo de progressão do melanoma apresenta alterações morfológicas e moleculares envolvendo expressão gênica global, metilação do DNA, marcas em histonas e alterações na expressão de microRNAs em diferentes linhagens após ciclos repetidos de impedimento de ancoragem. Juntos, esses dados sugerem a participação de mecanismos epigenéticos na transformação maligna de melanócitos e reforçam a ligação entre doença e meio ambiente (Oba-Shinjo *et al.*, 2006; Molognoni *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012b).

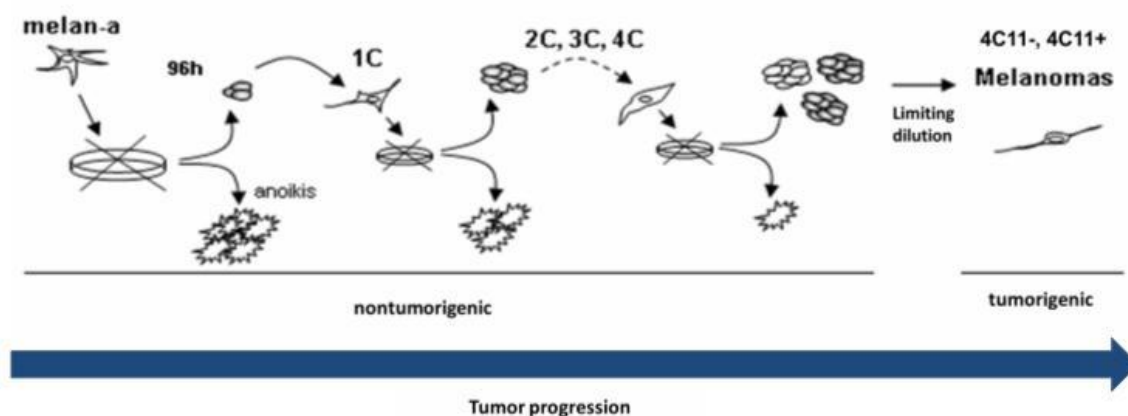


Figura 3. Modelo de progressão de melanoma associado a estresse sustentado. Melanócitos não-tumorigênicos melan-a foram submetidos a repetidos ciclos de bloqueio de adesão, apresentando esferoides de células resistentes ao anoikis. Após submeter a linhagem pré-maligna 4C a mais um ciclo de desadesão, os esferoides obtidos foram submetidos à diluição limitante, originando diferentes linhagens tumorais não metastáticas (4C11-, por exemplo) e metastáticas (4C11+ e outras), apresentando crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade *in vivo*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar o impacto de alterações das proteínas Tet1 e Tet2 e dos níveis de 5-hidroximetilcitosina durante a progressão do melanoma.

Objetivos específicos

1. Avaliar alterações na expressão dos genes e das proteínas Tet1 e Tet2, bem como dos níveis de 5hmC nas linhagens do modelo de transformação maligna de melanócitos que caracterizam fases distintas na progressão do melanoma;
2. Verificar se há associação entre a expressão dos genes e das proteínas Tet1 e Tet2, os níveis de 5hmC e características de pluripotência nas linhagens murinas de estudo melan-a, 4C, 4C11- e 4C11+;
3. Efetuar a validação dos achados com as linhagens murinas em linhagens humanas de melanoma metastático e espécimes tumorais representando estágios clínicos distintos na progressão de melanomas.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células murinas

As linhagens melan-a, 4C, 4C11- e 4C11+ foram cultivadas em placas de cultura de 100 mm de diâmetro (*Sarstedt*) contendo 10 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640; Gibco) pH 6,9 e suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Gibco BRL). À linhagem murina melan-a, foram acrescentados 200 nM de *12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (PMA; Sigma). As células foram cultivadas até a confluência aproximada de 80%, permanecendo em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Cultura de células humanas

Culturas primárias de melanócitos humanos, gentilmente cedidas pela Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, foram obtidas a partir do prepúcio de recém-nascidos, e mantidas em 10 mL de meio basal para melanócitos 254CF acrescido de Suplemento para Crescimento de

Melanócitos Humanos (HMGS) e 0,2 mM de cloreto de cálcio (Gibco), permanecendo em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A obtenção e uso destas células foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo 943/09 (Profa Dra Silvy Stuchi Maria-Engler; Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo).

As linhagens humanas de melanoma metastático Mel-2, Mel-3, Mel-4, Mel-11, Mel-14, Mel-25 e Mel 28, estabelecidas a partir de biópsias de pacientes pela Dra. Débora Castanheira da Silva, foram cultivadas em 10 mL de meio RPMI 1640 pH 7,2 suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), permanecendo em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os sítios anatômicos dos quais o tecido tumoral foi retirado para obtenção das culturas são: Mel-2, metástase em linfonodo supra-clavicular à direita; Mel-3, Mel-2 após a recidiva da doença; Mel-4, metástase em linfonodo axilar; Mel-11, metástase cerebral; Mel-14, metástase em linfonodo axilar; Mel-25, desconhecido, e Mel-28, metástase subcutânea de dorso.

O procedimento para obtenção e uso destas culturas celulares recebeu aprovação do Comitê de Ética da Fundação Antônio Prudente, Hospital AC Camargo, 096/98 (Dra Débora Castanheira Pereira da Silva, Departamento de Oncologia Cutânea do Hospital AC Camargo).

Extração de RNA e síntese de cDNA

Após as diferentes linhagens terem atingido aproximadamente 70% de confluência, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com 3 mL de tampão fosfato salina (PBS). Em seguida, foram adicionados 2 mL do reagente TRIzol® à cultura (Invitrogen). O conteúdo da placa foi retirado utilizando-se *cell scraper*, e separado em alíquotas de 1 mL em tubos de 1,5 mL. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada tubo, a mistura foi homogeneizada por inversão e então incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, resultando na separação das fases. A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foram adicionados 500 µL de isopropanol. A amostra foi deixada a -20°C durante toda a noite para precipitação do RNA. O tubo foi então centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75%, homogeneizado com o auxílio de vórtex e centrifugado a 7000 rpm por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi seco emborcando-se o tubo e deixando-o aberto por aproximadamente 10

minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* foi solubilizado em água tratada com dietil-pirocarbonato – DEPC – 0,1%. O extrato de RNA foi armazenado a -80°C.

As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotômetro *Nanodrop* (Thermo Scientific), avaliando-se as razões A260/A280 e A260/A230 (1,6-2,1) para garantir sua qualidade, sem a contaminação por proteínas e sais. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio 0,1 µg/mL ou SYBR® Safe 1 µg/mL (*Life Technologies*) para verificação da qualidade das bandas ribossomais 28S e 18S (razão 2:1).

O cDNA foi sintetizado utilizando o kit *QuantiTect Reverse Transcription* (QIAGEN) que permite a remoção integrada de possível contaminação por DNA genômico, segundo especificações do fabricante. Inicialmente, em tubo de 0,2 mL, foram introduzidos 2 µL de *gDNA Wipeout Buffer*, 1 µg de RNA e água RNase-free para completar o volume final da reação equivalente a 14 µL. A solução foi incubada a 42°C por 2 minutos e, em seguida, foram adicionados 4 µL de *Quantiscript RT Buffer 5x*, 1 µL de *RT Primer Mix* e 1 µL da enzima *Quantiscript Reverse Transcriptase*. Por fim, a reação foi incubada a 42°C por 15 minutos e 95°C por 3 minutos.

Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, as células foram cultivadas em placa de 150 mm de diâmetro até atingirem confluência (aproximadamente 10⁷ células). Inicialmente, o meio foi descartado e a placa lavada com 3 mL de PBS. Em seguida, foram adicionados 15 mL de meio RPMI pH 6,9 sem SFB; as células foram removidas da placa utilizando-se *cell scraper* e transferidas para um tubo de 15 mL. O tubo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, o meio foi descartado e foram adicionados 4 mL do tampão de lise celular *Cell Lysis Solution* (QIAGEN) e 40 µL (20 mg/mL) de RNase A (Invitrogen). Após incubação em banho-maria por 1 hora a 37°C, foram adicionados 2 mL de solução para precipitação de proteínas *Protein Precipitation Solution* (QIAGEN), a solução foi homogeneizada em vórtex por 20 segundos e o tubo centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 15 mL; foram adicionados 5 mL de isopropanol para precipitação do DNA e a solução foi homogeneizada por inversão. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado 2 vezes com 3 mL de etanol 70% e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi seco emborcando-se o tubo e deixando-o aberto à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Por fim, o precipitado foi solubilizado em 100 µL de água DEPC, transferido para um tubo de 1,5 mL e armazenado a -20°C.

Extração de proteína

Após as diferentes linhagens terem atingido aproximadamente 80% de confluência, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com 3 mL de PBS. Foram adicionados 400 µL de tampão de lise RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 [Invitrogen], NaCl 150 mM [Merck], NP-40 1% [Amresco], SDS 0,1% [Invitrogen] e desoxicolato de sódio 0,5% [Amresco]) contendo inibidores de proteases aprotinina (2 µg/mL), pepstatina (1 µg/mL), leupeptina (10 µg/mL) e PMSF 1 mM. Todo o conteúdo da placa foi removido utilizando-se *cell scraper* e transferido para um tubo de 1,5 mL. O tubo foi mantido sob agitação a 4°C por 20 minutos. Em seguida, o extrato foi sonicado 3 vezes por 10 segundos cada à amplitude de 20%. Então, o tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante, transferido para um novo tubo. A amostra foi armazenada a -80°C. Os extratos foram quantificados pela técnica de Coomassie Blue (Bradford, 1976). O reagente Coomassie Blue interage com as proteínas formando complexos de coloração azul. A intensidade da coloração depende da concentração de proteínas na amostra e a sua quantificação é feita mediante espectrofotometria. Foi feita uma curva padrão com BSA 1 mg/mL (INLAB) com os pontos branco (sem BSA), 5, 10, 15 e 20 mg/mL. Assim, 0, 5, 10, 15 e 20 µL de BSA foram acrescentados em tubos de 1,5 mL separados contendo 800, 795, 790, 785 e 780 µL de água destilada e, em seguida, foram adicionados 200 µL do reagente concentrado Bio-Rad protein assay dye (Bio-Rad). 2 µL de cada amostra foram adicionadas em tubos de 1,5 mL contendo 798 µL de água destilada e 200 µL do reagente concentrado. Os valores de absorbância a 620 nm obtidos foram utilizados para determinação de uma reta do tipo $y=ax+b$, onde o valor de 'y' corresponde à absorbância do extrato proteico, 'a' ao coeficiente angular da reta, 'b' o valor em que a reta cruza o eixo y e 'x' à concentração do extrato proteico. Assim, os valores de absorbância encontrados para as amostras foram utilizados para determinar suas concentrações.

PCR quantitativa em tempo real (two-step RT-qPCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados em éxons diferentes para evitar a amplificação do DNA genômico. Para isso, foi utilizado o programa *Primer3* (v. 4.0.0) e a especificidade das sequências foi verificada pelo programa BLAT (*UCSC Genome Bioinformatics*). Os *primers* foram sintetizados pela Sigma (St. Louis, EUA). As sequências dos *primers* utilizados são:

Tet1–mouse:

Forward: 5'-TCCCACAGACCGAAGATGTA-3'

Reverse: 5'-ACGAACAGCCAAAGGAGAAG-3'

Tet2–mouse:

Forward: 5'-TTGGACTTCTCTGCTCATTCC-3'

Reverse: 5'-CTCCGACTTCTCGATTGTCTTC-3'

TET1-humano:

Forward: 5'-AGGAAACGCAATAAGGATAGA-3'

Reverse: 5'-CTTCATCACTGCTTCTTCTTAAA-3'

TET2-humano:

Forward: 5'-CAAGATCCCAAGGAAGTTTAAG-3'

Reverse: 5'-CTTATATGTTGGTGCCATAAGAG-3'

A quantificação do cDNA foi feita por PCR quantitativa em tempo real utilizando-se o sistema de detecção *Corbett Rotor-Gene* 6000. As amostras foram preparadas em tubo de 0,2 mL, sendo adicionados à reação 7,5 µL do reagente SYBR® *Green PCR master mix* (QIAGEN), 3,1 µL de água DEPC e 1,2 µL de cada *primer*, *forward* e *reverse*, à concentração final de 400 nM. Por fim, foram adicionados 2 µL de amostra de cDNA (200 ng por reação). As condições de ciclagem foram: 5 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 5 segundos a 95°C e 10 segundos a 60°C. O ensaio foi realizado em duplicata biológica e técnica. Utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, foi quantificado o valor de expressão dos genes *Tet1/TET1* e *Tet2/TET2* em relação ao valor de expressão do gene referência endógena *Actb/ACTB*. Inicialmente, o *Cq* (*cycle threshold*) foi determinado pelo valor do ciclo no qual a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo, e o ΔCq , calculado por Cq gene – Cq gene referência. Em seguida, a linhagem melan-a foi escolhida como amostra calibradora e utilizada para o cálculo do $\Delta\Delta Cq$ através da diferença ΔCq amostra – ΔCq amostra calibradora, e este valor de $\Delta\Delta Cq$ foi aplicado na equação $2^{-\Delta\Delta Cq}$, resultando no valor normalizado de expressão gênica.

HPLC e espectrometria de massa

A mensuração dos níveis de 5-hidroximetilcitosina foi realizada em colaboração com a Dra Ana Paula Loureiro e o Dr. Tiago Franco de Oliveira (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo). O ensaio foi realizado em duplicata biológica, da seguinte maneira:

Hidrólise enzimática do DNA

Para a reação de hidrólise enzimática, alíquotas contendo 6 µg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) foram adicionadas a 2,5 µL de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) e 1,2 unidades de DNase 1. As amostras foram incubadas a 37°C por 1h. Após a incubação, foram adicionados 0,0005 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 1,2 unidades de fosfatase alcalina. As amostras foram novamente incubadas a 37°C por 1h com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora, o volume final da incubação (60 µL) foi centrifugado por 10 min a 9.300 x g e o sobrenadante foi coletado. Alíquotas de 20 µL (2 µg de DNA) foram injetadas em um sistema de HPLC-UV, para a quantificação da 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mdC) e da 2'-desoxicitidina (dC). Concomitantemente, alíquotas contendo 1 µg de DNA foram injetadas em um sistema de HPLC-ESI-MS/MS para a quantificação da 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina (5-hmdC).

Determinação dos níveis de 5-metil-2'-desoxicitidina em DNA por HPLC-UV

As alíquotas de DNA foram injetadas em um sistema analítico de HPLC da empresa *Shimadzu Corporation* (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL– 20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A. Os dados foram processados pelo software *LC-Solution 1.21* (Shimadzu, Japão). A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises: Coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH:H₂O (v:v) com 0,1% de ácido fórmico (0-25 min, 0-36% de CH₃OH:H₂O; 25-27 min, 36-0% de CH₃OH:H₂O; 27-37 min, 0% de CH₃OH:H₂O), com um fluxo de 1 mL/min, 30°C. O detector de DAD foi fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a quantificação da 5-metil-dC. Curvas de calibração foram feitas no intervalo de 0,05-1 nmol para dC e de 0,005-0,1 nmol para 5-mdC. A porcentagem da metilação global do DNA foi calculada usando a seguinte equação:

$$5 - \text{mdC}_{(\%) } = \frac{5 - \text{mdC}_{(\text{nmol})} \times 100}{5 - \text{mdC}_{(\text{nmol})} + 5 - \text{mdC}_{(\text{nmol})}}$$

Quantificação dos níveis de 5-hidroximetil-2'-desoxicitidina por HPLC-ESI-MS/MS-MRM

As análises foram conduzidas em um sistema constituído por HPLC Agilent série 1200 (Wilmington, EUA) equipado com uma bomba binária (Agilent 1200 G1312B), uma bomba isocrática (Agilent 1200 G1310A), um forno para coluna (Agilent 1200 G1316B), um detector de absorvância de arranjo de diodos (Agilent 1200 DAD G1315C) e um injetor automático (G1367C Agilent 1200). O sistema de HPLC é integrado a um espectrômetro de massas *Linear Quadrupole Ion Trap* modelo 4000 QTRAP da empresa Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments (Foster City, EUA), disponibilizado pelo Prof. Dr. Paolo Di Mascio (Instituto de Química, IQUSP, São Paulo, Brasil). As análises foram conduzidas com ionização por *electrospray* em modo positivo, utilizando-se os seguintes parâmetros otimizados: gás de nebulização, 50 psi; gás na fonte de íons, 50 psi; gás de dissociação induzida por colisão, HIGH; temperatura da fonte do ESI 600°C; potencial de dissociação 26 V; potencial de entrada 10 V; energia de colisão 15 eV, potencial de saída da célula 20 V; e tensão do *spray* de íons 5500 V. Foi utilizado o modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), com as seguintes fragmentações: m/z 242 [M+H]⁺ → m/z 126 [M - 2'-desoxirribose+H]⁺, para a quantificação da 5-mdC; m/z 258 [M+H]⁺ → m/z 142 [M - 2'-desoxirribose+H]⁺, para a quantificação da 5-hmdC. Os dados foram processados utilizando-se o *software Analyst* 1.4 (Applied Biosystems, USA). O seguinte sistema cromatográfico foi utilizado: coluna Luna C18 (2) 150 mm x 2,0 mm, ID, 3 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com gradiente de ácido fórmico 0,1% em água (Solução A) e CH₃OH com 0,1% de ácido fórmico (Solução B), a um fluxo de 150 µL/min, 35°C, nas seguintes condições: 0-25 min, 0-30% B; 25-27 min, 30-70% B; 27-29 min, 70-0% B; 29-40 min, 0% B. As seguintes condições de posicionamento para a válvula de comutação de fluxo foram empregadas: 0-0,5 min, posição 0; 0,5-9 min, posição 1; 9-40 min, posição 0. A porcentagem da hidroximetilação global do DNA foi calculada usando as seguintes equações:

$$5 - \text{hmdC}_{(\text{nmol})} = \frac{5 - \text{hmdC}_{(\text{área})} \times 5 - \text{mdC}_{(\text{nmol})}}{5 - \text{mdC}_{(\text{área})}}$$

$$5 - \text{hmdC}_{(\%) } = \frac{5 - \text{hmdC}_{(\text{nmol})} \times 100}{5 - \text{hmdC}_{(\text{nmol})} + 5 - \text{mdC}_{(\text{nmol})} + 5 - \text{mdC}_{(\text{nmol})}}$$

Western Blot

Trinta (30) µg do extrato proteico de cada amostra foram separados em gel reduzido de poliacrilamida (SDS-Page) sob eletroforese a 25 mA. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Amersham) a 100 V por 2 horas, que foi então bloqueada durante 1 hora com 5% de leite Molico® em TBS-Tween (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 100 mM de NaCl e 0,05% de Tween-20). A membrana foi dividida em duas partes, uma incubada com anticorpo anti-Tet1 ou anti-Tet2 (Millipore) específico *overnight* a 4°C sob agitação e outra com anticorpo anti-Actb (Santa Cruz Biotechnology). Após o período de incubação, a membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos em TBS-Tween e, em seguida, foi incubada com anticorpo secundário durante 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos e a expressão proteica foi avaliada utilizando o kit de detecção de quimioluminescência *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific). A membrana foi exposta e revelada no sistema Alliance 4.7 (Uvitec, Cambridge). A avaliação da massa molecular das proteínas separadas no gel de poliacrilamida foi realizada com o padrão de peso *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Scientific).

Imunofluorescência indireta

Inicialmente, lamínulas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora a 60 rpm em solução de Extran e água destilada, secas e autoclavadas. Em seguida, 5×10^4 células das linhagens murinas ma, 4C e 4C11- e 3×10^4 células da linhagem murina 4C11+ foram plaqueadas sobre as lamínulas inseridas em placas de 24 *wells*. Após 30 horas de adesão, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1x gelado e fixadas em paraformaldeído 4% gelado durante 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x gelado e em seguida foram adicionados 500 µL de Triton X-100 com glicina (Triton X-100 0,1%, 50 mM glicina, 3 mM CaCl₂ e 2 mM MgCl₂) para a permeabilização durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x gelado e bloqueadas após adição de 500 µL de BSA 1% em PBS à temperatura ambiente. Após 30 minutos, foi adicionado o anticorpo primário diluído em BSA 1% em PBS-Tween, e as lamínulas foram mantidas a 4°C durante toda a noite. No dia seguinte, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x gelado e foram adicionados o anticorpo secundário conjugado à Alexa 488 (Molecular Probes) e DAPI (para a marcação do DNA no núcleo das células), previamente diluídos em solução de BSA 1% em PBS-Tween. As lamínulas foram mantidas protegidas da luz durante 1 hora a temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram montadas usando-se o reagente *anti-fade* (*ProLong Gold Antifade Reagent*; Invitrogen) que inibe a perda da emissão de

fluorescência e as imagens serão capturadas por microscopia utilizando-se o *FLoid Cell Imaging Station* (Life Technologies).

RESULTADOS

Como tanto *Tet1* quanto *Tet2* associam-se a níveis de 5hmC e características de pluripotência, foram avaliadas as expressões destes dois genes, em relação ao controle endógeno *Actb*, nas diferentes linhagens do modelo murino de progressão tumoral por meio de experimentos de RT-qPCR. Inicialmente, foi observado um perfil de aumento de expressão do gene *Tet1* nas linhagens intermediárias 4C (melanócitos pré-malignos) e 4C11- (células de melanoma não metastático) em relação às linhagens melan-a (melanócitos parentais) e 4C11+ (células de melanoma metastático) (**Figura 4**). Estas linhagens que apresentam elevada expressão do transcrito *Tet1* também apresentam fenótipo mesenquimal (**Figura 5**) e perda de marcadores de diferenciação (Camila Ferreira de Souza, manuscrito em preparação).

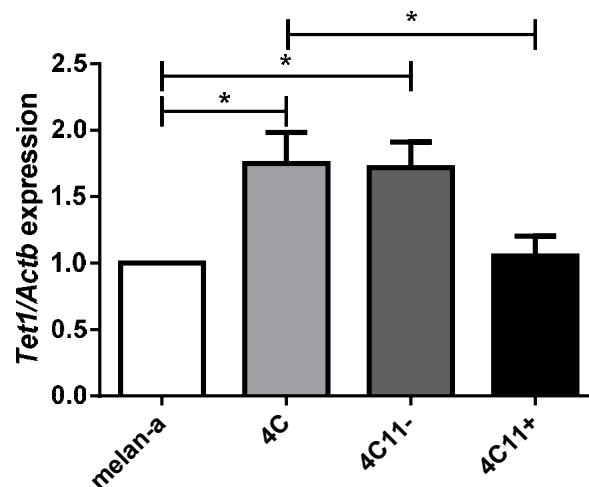


Figura 4. Linhagens celulares correspondendo a fases intermediárias da progressão do melanoma apresentam aumento na expressão do transcrito *Tet1*. Expressão gênica de *Tet1* em relação ao gene referência endógena *Actb* nas linhagens do modelo murino de progressão tumoral, conforme avaliado por RT-qPCR. melan-a: melanócitos não tumorigênicos; 4C: melanócitos pré-malignos; 4C11-: células de melanoma não metastático; 4C11+: células de melanoma metastático. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

Posteriormente, a comparação de expressão do gene *Tet2* entre as linhagens do modelo murino mostrou um perfil de aumento progressivo, sendo que os maiores níveis de expressão foram observados na linhagem de melanoma metastático 4C11+ (**Figura 6**).

Em seguida, visando relacionar a expressão gênica de *Tet1* e *Tet2* e os níveis de 5hmC, foram realizados ensaios de HPLC e espectrometria de massa. Os níveis de 5hmC mensurados no DNA genômico das linhagens murinas de estudo foram maiores na linhagem de melanoma metastático 4C11+ em relação às demais linhagens (**Figura 7**).

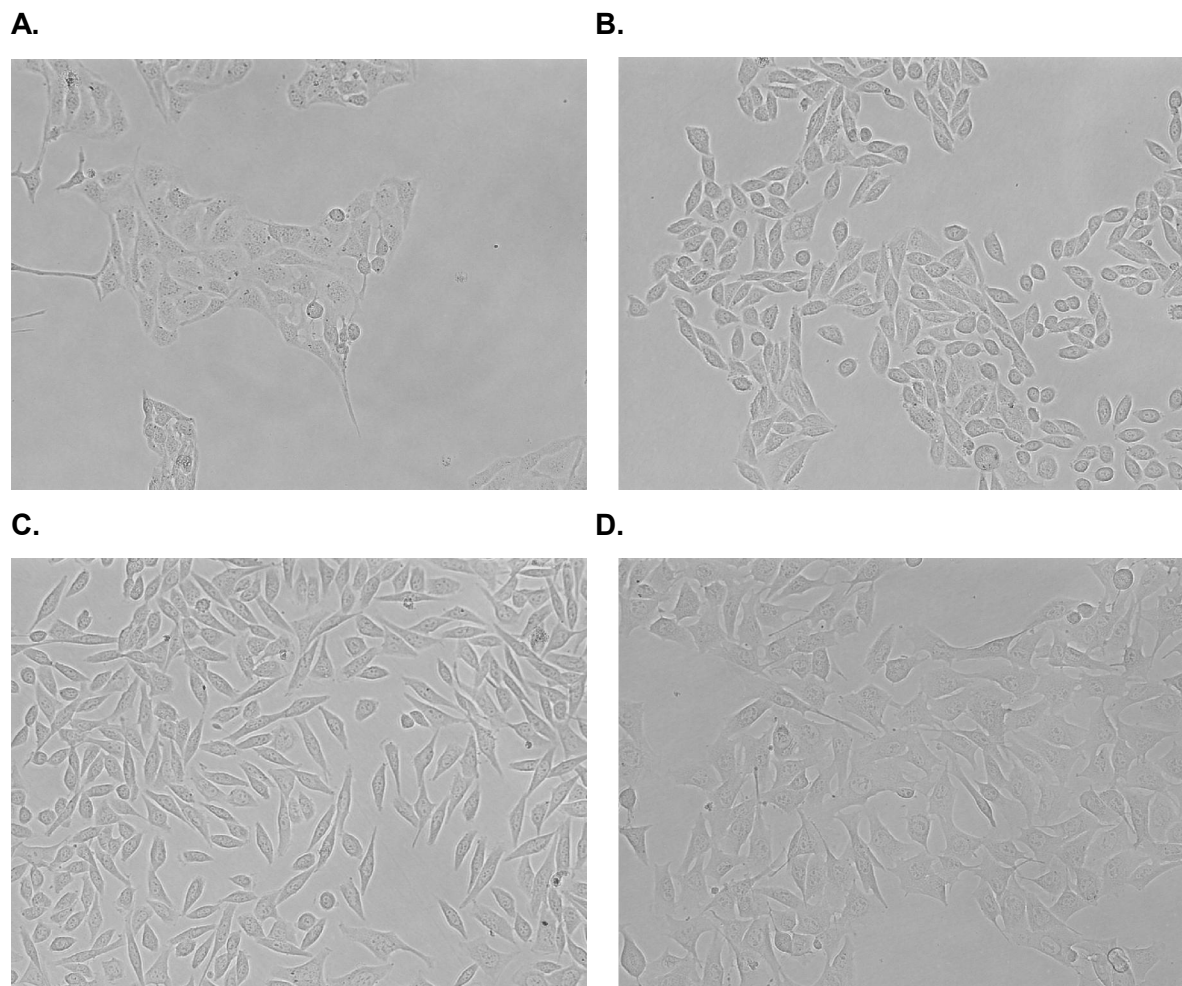


Figura 5. Linhagens celulares correspondendo a etapas intermediárias da progressão do melanoma apresentam fenótipo mesenquimal. Fotomicrografias das linhagens celulares do modelo murino de progressão tumoral: **A.** melan-a; **B.** 4C; **C.** 4C11-; **D.** 4C11+ (aumento de 200x).

A expressão proteica de *Tet1* e *Tet2* foi avaliada por ensaios de *Western blot* e, em seguida, análise semiquantitativa por densitometria das bandas. Foi observado aumento na expressão de *Tet1* nas linhagens 4C e 4C11+ (**Figuras 8A e 8B**). A linhagem 4C apresenta fenótipo mesenquimal em relação ao fenótipo epitelial da linhagem melan-a, o que caracteriza uma transição epitélio-mesênquima (EMT). Já a linhagem 4C11+ apresenta fenótipo epitelial

em relação ao fenótipo mesenquimal da linhagem 4C11-, o que caracteriza uma transição mesênquima-epitélio (MET). A expressão de *Tet2* encontra-se aumentada na linhagem 4C11+ em relação às outras linhagens (**Figuras 9A e 9B**), estando de acordo com a expressão gênica de *Tet2*.

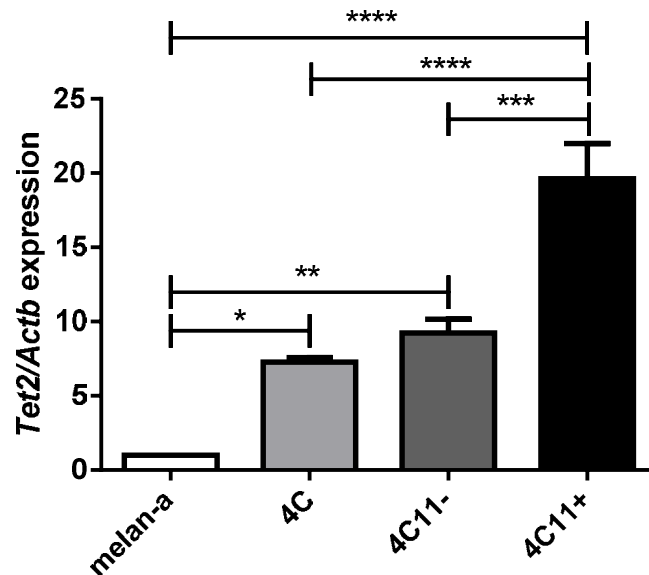


Figura 6. Aumento progressivo na expressão de *Tet2* durante a progressão do melanoma. Expressão gênica de *Tet2* em relação ao gene referência endógena *Actb* nas linhagens do modelo murino de progressão tumoral, conforme avaliado por RT-qPCR. melan-a: melanócitos não tumorigênicos; 4C: melanócitos pré-malignos; 4C11-: células de melanoma não metastático; 4C11+: células de melanoma metastático. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

A localização celular de *Tet2* foi analisada por ensaio de imunofluorescência indireta, tendo sido observada a localização nuclear da proteína, sendo que o sinal obtido foi maior na linhagem 4C11+, em concordância com a expressão gênica e expressão proteica (**Figura 10**).

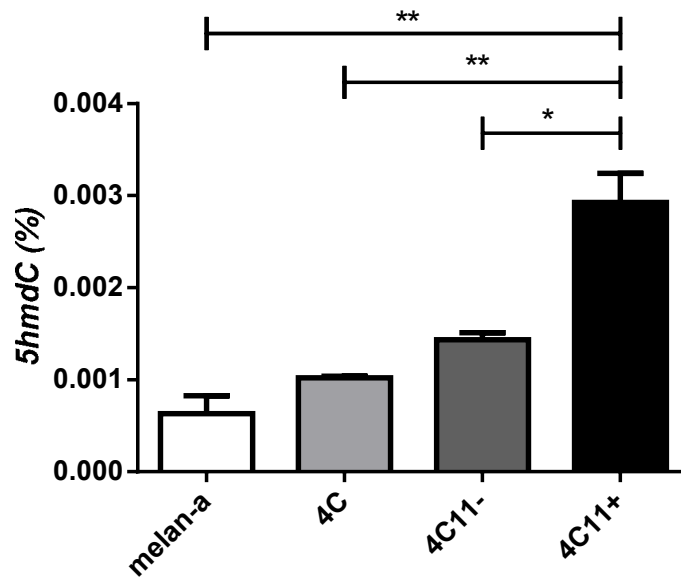


Figura 7. Aumento progressivo do conteúdo de 5hmC durante a progressão do melanoma. Níveis de 5hmC das linhagens do modelo murino de progressão tumoral. Os níveis de 5hmC da linhagem 4C11+ apresentam aumento significativo em relação às linhagens melan-a ($P<0,01$), 4C ($P<0,01$) e 4C11- ($P<0,05$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$. melan-a: melanócitos não tumorigênicos; 4C: melanócitos pré-malignos; 4C11-: células de melanoma não metastático; 4C11+: células de melanoma metastático.

Por fim, foram avaliadas as expressões dos genes *TET1* e *TET2* nas linhagens humanas de melanoma metastático. As linhagens metastáticas menos agressivas Mel-2, Mel-3, Mel-4 e Mel-11 apresentaram expressão elevada de *TET1*, enquanto foi observada ausência na sua expressão nas linhagens mais agressivas Mel-14, Mel-25 e Mel-28 (**Figuras 11 e 12**). Foi observado efeito similar na expressão do gene *TET2*, tendo sido observado aumento na expressão do gene nas linhagens menos agressivas Mel-2, Mel-3, Mel-4 e Mel-11 em comparação com perda ou ausência de expressão nas linhagens mais agressivas Mel-14, Mel-25 e Mel-28 (**Figura 13**).

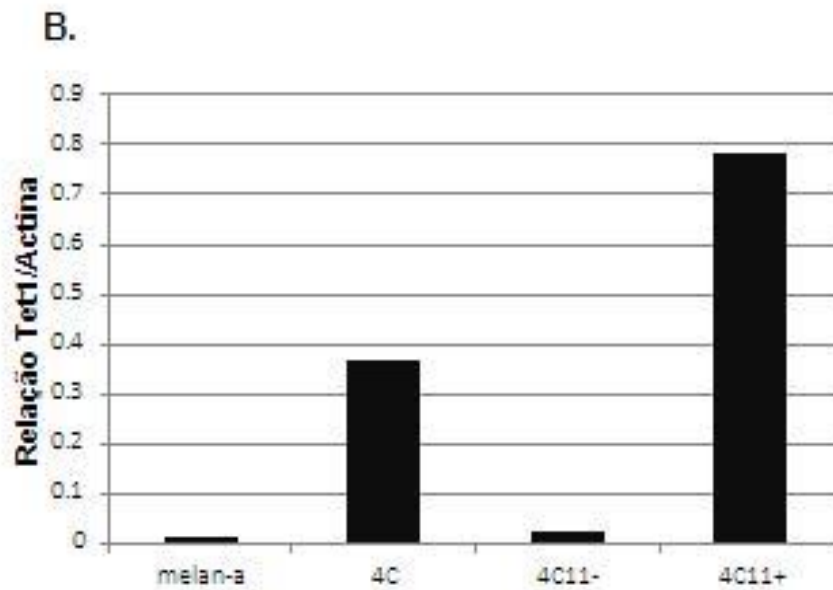
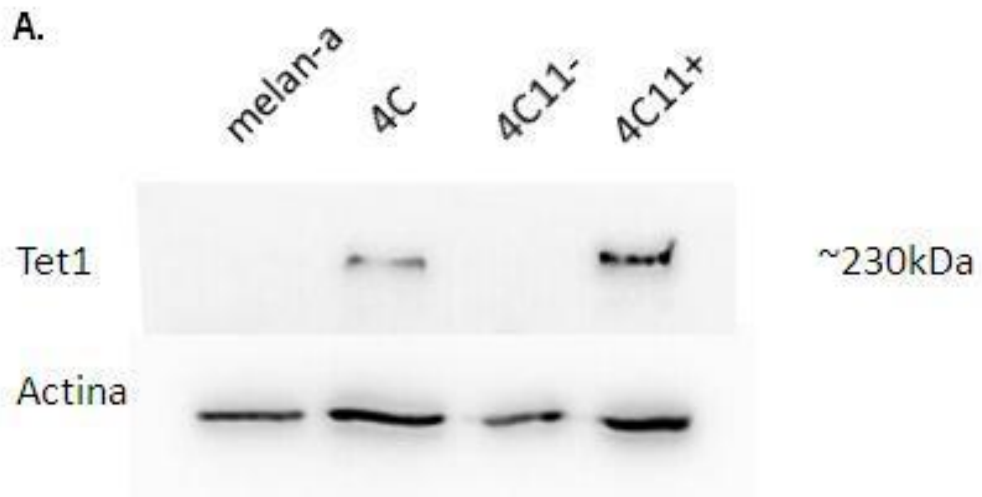


Figura 8. Expressão aumentada de Tet1 nas linhagens 4C e 4C11+. (A) Expressão proteica de Tet1 nas linhagens do modelo murino de progressão tumoral. A linhagem 4C apresenta fenótipo mesenquimal em relação à linhagem melan-a, de fenótipo epitelial (EMT). A linhagem 4C11+ apresenta fenótipo epitelial em relação à linhagem 4C11-, de fenótipo mesenquimal (MET); (B) Densitometria das bandas de Tet1 em relação ao controle endógeno actina. melan-a: melanócitos não tumorigênicos; 4C: melanócitos pré-malignos; 4C11-: células de melanoma não metastático; 4C11+: células de melanoma metastático.

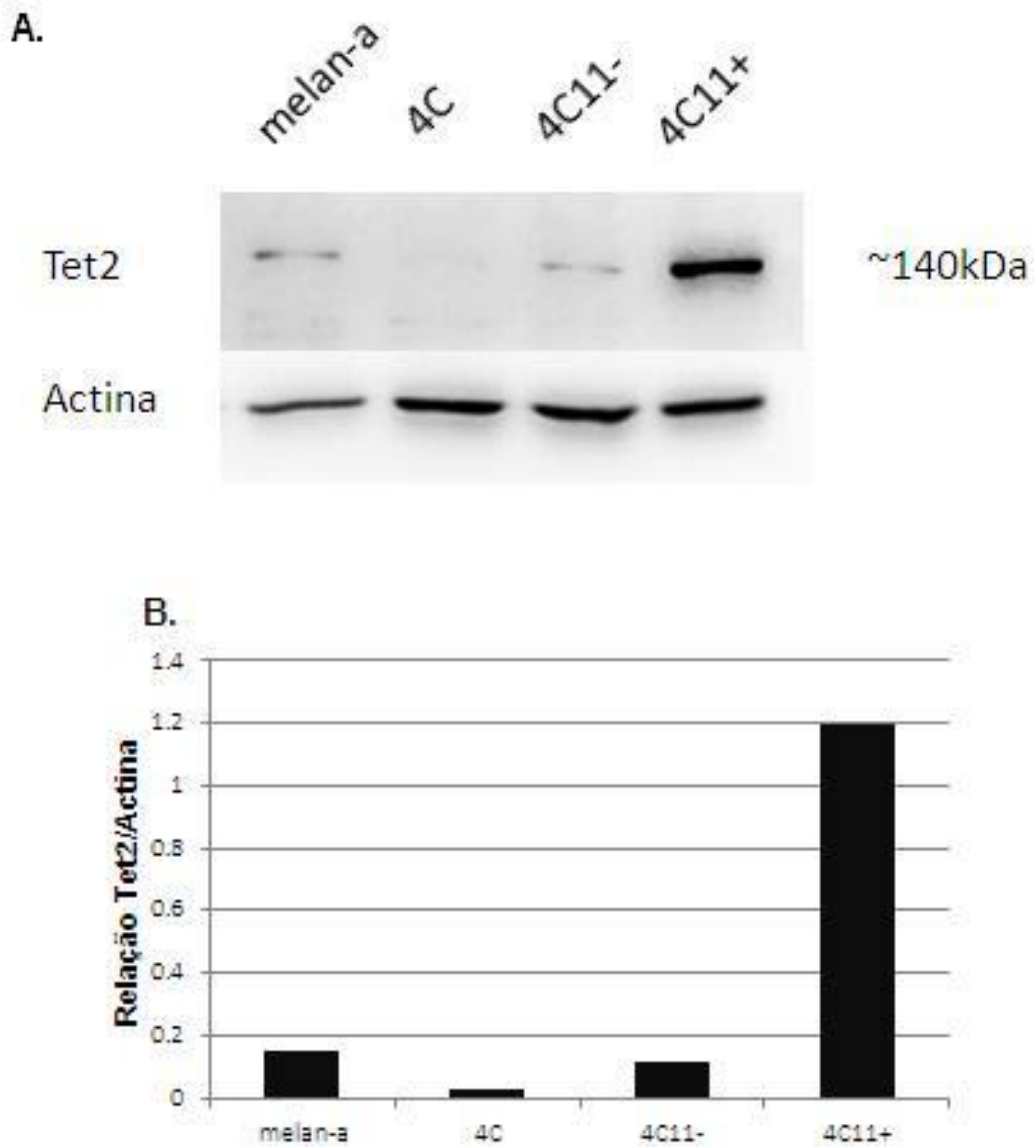


Figura 9. Expressão aumentada de Tet2 na linhagem 4C11+. (A) expressão proteica de Tet2 nas linhagens do modelo murino de progressão tumoral. A linhagem de melanoma metastático 4C11+ apresenta os maiores níveis de expressão de Tet2 e também maior agressividade dentre as linhagens do modelo; (B) Densitometria das bandas de Tet2 em relação ao controle endógeno actina. melan-a: melanócitos não tumorigênicos; 4C: melanócitos pré-malignos; 4C11-: células de melanoma não metastático; 4C11+: células de melanoma metastático.

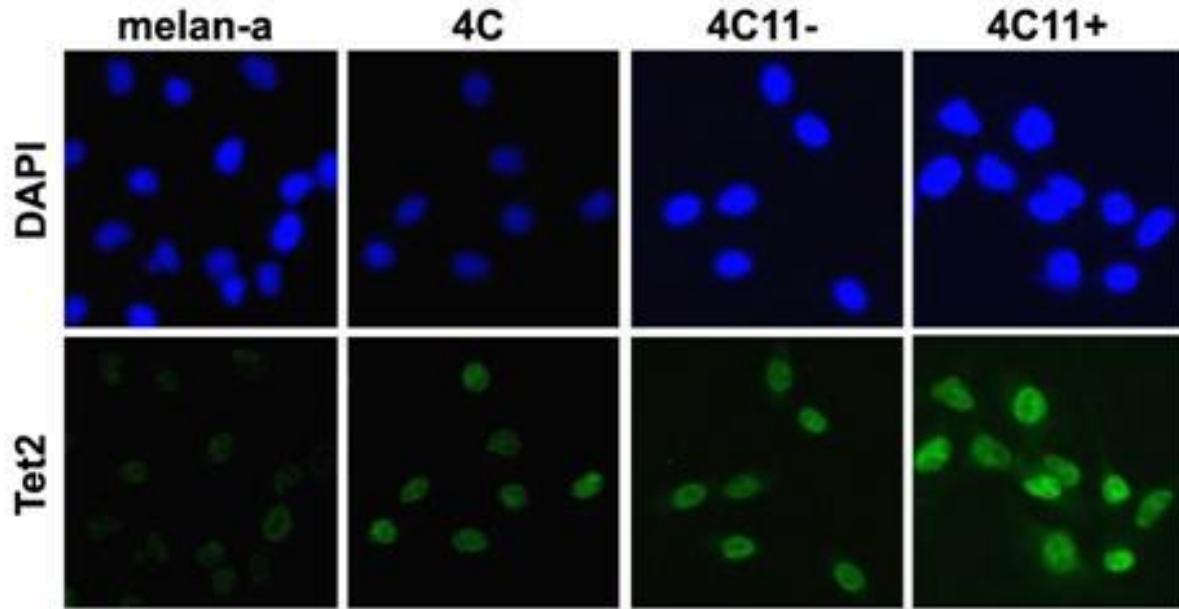


Figura 10. Localização nuclear da proteína Tet2 nas linhagens do modelo de progressão de melanoma. A localização de Tet2 foi avaliada por imunofluorescência indireta (verde). Os núcleos foram visualizados pela marcação com DAPI (azul).

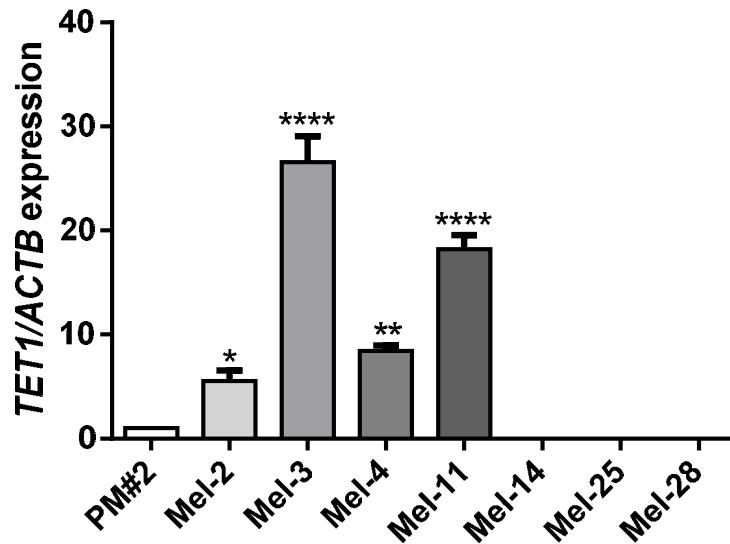


Figura 11. Expressão de TET1 em células de melanoma humano. Expressão gênica de TET1 em relação ao controle endógeno ACTB nas linhagens humanas de melanoma metastático. Há ausência na expressão do gene nas linhagens mais agressivas (Mel-14, Mel-25 e Mel-28) comparado às linhagens menos agressivas (Mel-2, Mel-3, Mel-4 e Mel-11). *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001.

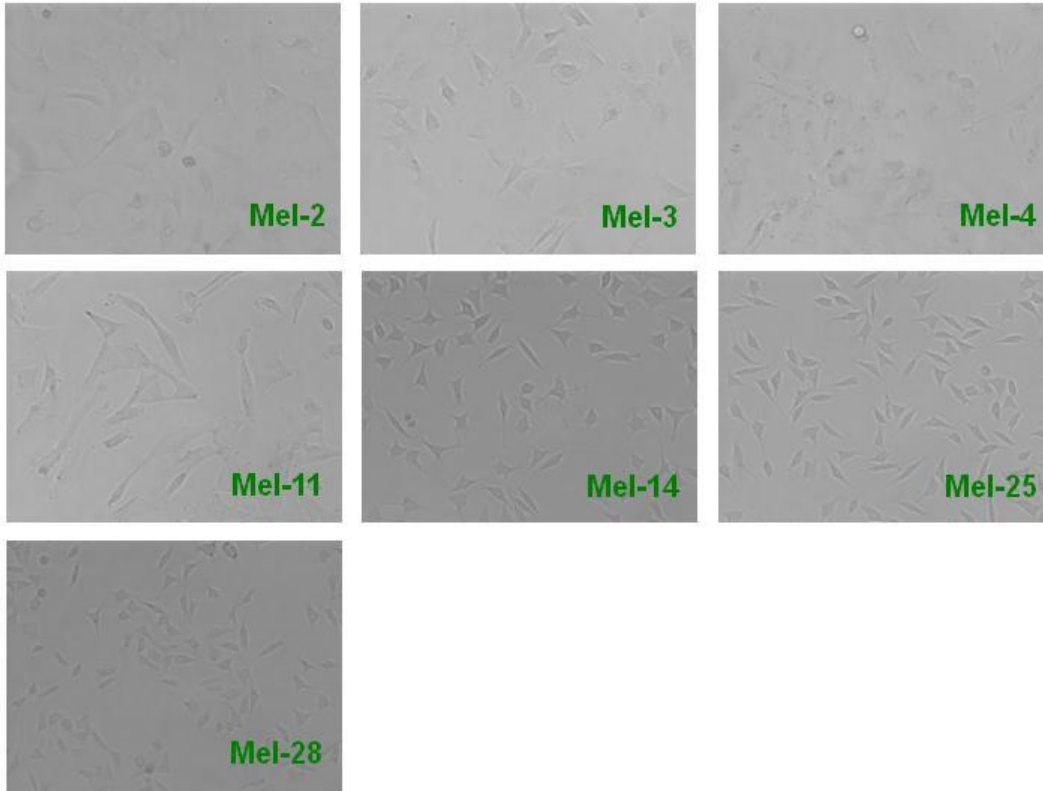


Figura 12. Culturas celulares correspondendo a melanomas metastáticos humanos. Fotomicrografias das células Mel-2 (metástase em linfonodo supra-clavicular à direita), Mel-3 (Mel-2 após a recidiva da doença), Mel-4 (metástase em linfonodo axilar), Mel-11 (metástase cerebral), Mel-14 (metástase em linfonodo axilar), Mel-25 (sítio anatômico desconhecido) e Mel-28 (metástase subcutânea em dorso) (aumento de 200x; cedido por Camila Ferreira de Souza).

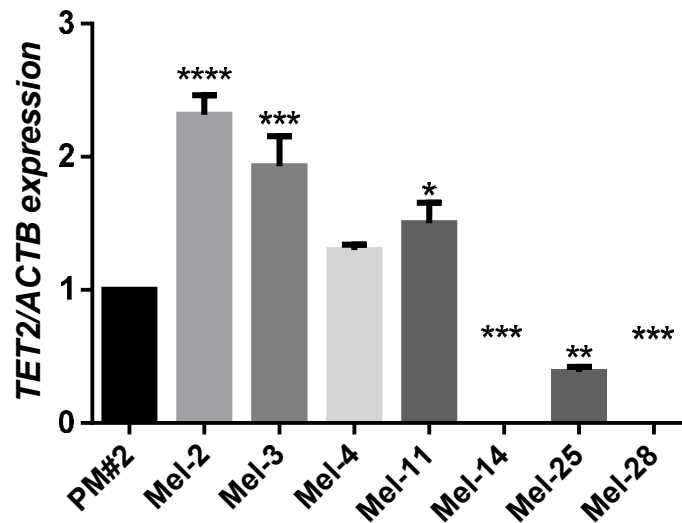


Figura 13. Expressão de TET2 em células de melanoma humano. Expressão gênica de *TET2* em relação ao controle endógeno *ACTB* nas linhagens humanas de melanoma metastático. Há ausência ou diminuição na expressão do gene nas células mais agressivas Mel-14, Mel-25 e Mel-28, em comparação com as linhagens que menos agressivas. Mel-2, Mel-3, Mel-4 e Mel-11. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os níveis de 5hmC relacionam-se com a expressão dos genes *Tet1* e *Tet2*, e a perda de 5hmC pode ter consequências para os níveis de metilação do DNA em sequências gênicas específicas, favorecendo a progressão tumoral (Williams *et al.*, 2012). Os dados de expressão gênica mostram o aumento de *Tet1* nas linhagens intermediárias 4C (pré-maligna) e 4C11- (melanoma não metastático) do modelo murino de progressão tumoral. Estas linhagens apresentam fenótipo mesenquimal, em relação às linhagens melan-a e 4C11+, que apresentam fenótipo epitelial (Molognoni *et al.*, 2011). Essas diferenças estão em concordância com a apresentação de marcadores de pluripotência (Molognoni *et al.*, 2011; Alice Santana Moraes, manuscrito em preparação) e perda de diferenciação (Camila Ferreira de Souza, manuscrito em preparação) observados nestas linhagens.

A expressão proteica de *Tet1* não é bem correlacionada com a expressão gênica, sendo que há uma inversão de expressão entre os transcritos das linhagens 4C11- (expressão gênica elevada e expressão proteica baixa) e 4C11+ (expressão gênica baixa e expressão proteica elevada). No entanto, estudos demonstram que medições dos níveis de mRNA correlacionam-se aos níveis de proteína em menos do que 40% das vezes, devido a mecanismos de pós-transcrição, pós-tradução, tempo de meia-vida das moléculas e limitações experimentais (Vogel & Marcotte, 2012; Kendrick, 2012).

Tet1 pode apresentar um papel duplo tanto na ativação quanto inibição da reprogramação celular, dependente de cofatores, como vitamina C, podendo influenciar na transição epitélio-mesênquima (EMT) e transição mesênquima-epitélio (MET) (Chen *et al.*, 2013). A expressão elevada de *Tet1* nas linhagens 4C (EMT) e 4C11+ (MET) poderia, então, ser responsável pelo fenótipo característico dessas linhagens.

A proteína *Tet1* liga-se em regiões gênicas, com preferência por sítios de início de transcrição (TSSs) e menos intensamente no corpo do gene (Williams *et al.*, 2012). Essa característica está relacionada ao fato de *Tet1* possuir um domínio CXXC que se liga tanto ao DNA metilado quanto não metilado e apresenta atividade de hidroxilase, gerando 5hmC (Zhang *et al.*, 2010). *Tet2* não apresenta o domínio CXXC, e não se sabe se existe preferência de ligação entre a proteína e locais específicos do gene. Essa variação entre *Tet1* e *Tet2* pode explicar a diferença observada entre os níveis de expressão gênica e proteica e o aumento progressivo de *Tet2* nas linhagens do modelo murino de progressão do melanoma, em particular o aumento de expressão de *Tet2* da linhagem de melanoma metastático 4C11+ em

relação às demais linhagens do modelo, podendo contribuir para a aquisição de características de invasão e metástase.

Os dados de expressão gênica de *Tet2* estão em concordância com os resultados obtidos nos ensaios de HPLC e espectrometria de massa, que mostram aumento dos níveis de 5hmC na linhagem 4C11+. Estudos indicam que 5hmC associada a promotores pode ter uma função dupla na regulação transcricional, tanto promovendo ativação quanto repressão de genes, enquanto sua presença no corpo do gene está envolvida somente com ativação gênica (Kim *et al.*, 2013), o que, no modelo murino, acrescenta a participação deste mecanismo epigenético nas alterações observadas ao longo da progressão do melanoma.

Estudos recentes demonstram a diminuição tanto dos níveis transcricionais e proteicos de TET1 e TET2 quanto do conteúdo genômico de 5hmC em estágios avançados do melanoma humano em relação a melanócitos e tecido saudável adjacente (Yang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2011), o que está de acordo com as observações dos níveis de expressão gênica nas células humanas de melanoma metastático. As células de melanoma menos agressivas apresentaram expressão gênica de *TET1* e *TET2* aumentada, enquanto as células de melanoma mais agressivas apresentaram diminuição parcial ou total de *TET1* e *TET2*.

Em resumo, os resultados obtidos até o momento indicam a presença de complexos mecanismos epigenéticos na progressão tumoral, e ensaios futuros permitirão um maior entendimento sobre as funções das proteínas Tet e a presença de 5hmC no melanoma.

Referências

Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 11(10): 726-734.

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR (1987). A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int J Cancer* 39: 414 – 418.

Bennet DC (2007). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*. 21: 27–38.

Brena RM, Costello JF (2007) Genome–epigenome interactions in cancer. *Human Molecular Genetics* 16, Review Issue 1: R96–R105.

Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genetics*, Vol. 10: 295-304.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho K-H, Aiba S, Bröcker E-B, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC (2005) Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *N Engl J Med.* 353: 2135-47

Dahl C, Grønbaek K, Guldborg P (2011) Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica Chimica Acta* 412: 831–836.

Ehrlich M (2009) DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 1(2): 239–259.

Frauer C, Hoffmann T, Bultmann S, Casa V, Cardoso MC, Antes I, Leonhardt H (2011) Recognition of 5-Hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA Domain. *PLoS ONE* 6(6): e21306.

Globish D, Munzel M, Muller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T (2010). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS ONE* 5(12):e15367.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R (2007) Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445: 851-857.

Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H (2011) Emerging roles of TET proteins and 5-Hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 10:16: 2662-68

Haass NK, Smalley KSM, Li L, Herlyn M (2005) Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 18: 150-159.

Herman JG, Baylin SB (2003) Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.

Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 2571-87.

Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466(7310):1129-33.

Jackson SA, Sridharan R (2013) The Nexus of Tet1 and the Pluripotency Network. *Cell Stem Cell* 12: 387-388.

Jin S-G, Jiang Y, Qiu R, Rauch TA, Wang Y, Schackert G, Krex D, Lu Q, Pfeifer GP (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res.* 71 (24): 7359-65.

Jones PA, Baylin SB (2002) The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nat. Rev. Genetics* 3: 415-428.

Kendrick N (2012) A gene's mRNA level measured by microarrays or RT-PCR does not necessarily predict its protein level: R^2 (or R_s) for plots of mRNA versus protein is < 0.4 . Kendrick Labs Inc.

Kim M, Park Y-K, Kang T-W, Lee S-H, Rhee Y-H, Park J-L, Kim, H-J, Lee D, Lee D, Kim S-Y, Kim YS (2013) Dynamic changes in DNA methylation and hydroxymethylation when hES cells undergo differentiation toward a neuronal lineage. *Human Molecular Genetics* 1-11.

Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, An J, Lamperti ED, Koh KP, Ganetzky R, Liu XS, Aravind L, Agarwal S, Maciejewski JP, Rao A (2010). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature* 468(7325):839-43.

Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, Huang Y, Cunniff K, Kian Peng, Nardone J, Laiho A, Tahiliani M, Sommer CA, Mostoslavsky G, Lahesmaa R, Orkin SH, Rodig SJ, Daley GQ, Rao A (2011) Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8(2): 200-213.

Kulis M, Esteller M (2010) DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics* 70: 27-56

Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q, Lee C, Hu D, Lian BQ, Kleffel S, Yang Y, Neiswender J, Khorasani AJ, Fang R, Lezcano C, Duncan LM, Scolyer RA, Thompson JF, Kakavand H, Houvras Y, Zon LI, Mihm Jr. MC, Kaiser UB, Schatton T, Woda BA, Murphy GF, Shi YG (2012) Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma. *Cell* 150: 1135-46.

Lin JY, Fisher DE (2007) Melanocyte Biology And Skin Pigmentation. *Nature* 445(7130): 843-50.

Liu C, Liu L, Chen X, Shen J, Shan J, Xu Y, Yang Z, Wu L, Xia F, Bie P, Cui Y, Bian X, Qian X (2013) Decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma through Downregulation of TET1. *PLoS ONE* 8(5): 1-9.

Molognoni F, Cruz AT, Meliso FM, Morais AS, Souza CF, Xander P, Bischof JM, Costa FF, Soares MB, Liang G, Jones PA, Jasiulionis MG (2011) Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. *Epigenetics* 6: 450-464.

Noughton AN, Polsky D (2002) Focus on Melanoma. *Cancer Cell* 2: 275-278.

Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal M, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, Jasiulionis MG (2006) Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment. *Neoplasia* 8(3): 231-241.

Perlis C, Herlyn M (2004) Recent Advances in Melanoma Biology. *The Oncologist* 9: 182-187

Ricca TI, Liang G, Suenaga APM, Han SW, Jones PA, Jasiulionis MG (2009) Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Expression Associated with Gene Demethylation Confers Anoikis Resistance in Early Phases of Melanocyte Malignant Transformation. *Transl. Oncol.* 2(4): 329-340.

Satyamoorthy K, Herlyn M (2002) Cellular and Molecular Biology of Human Melanoma. *Cancer Biology & Therapy* 1: 14-17.

Schinke C, Mo Y, Yu Y, Amiri K, Sosman J, Grealley J, Verma A (2010) Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma Res.* 20(4): 253-265.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* 31(1): 27-36.

Silva AGdS, Graves HA, Guffei A, Ricca TI, Mortara RA, Jasiulionis MG, Mai S (2010) Telomere-centromere-driven genomic instability contributes to karyotype evolution in a mouse model of melanoma. *Neoplasia* 12: 11-19.

Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M (2012) Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. *Adv Pharmacol* 65: 335-359.

Souza CF, Morais AS, Jasiulionis MG (2012a) Biomarkers as key contributors in treating malignant melanoma metastases. *Dermatol Res Pract* 2012: 156068.

Souza CF, Xander P, Monteiro AC, Silva AGdS, Silva DCP, da Silva DCP, Mai S, Bernardo V, Lopes JD, Jasiulionis MG (2012b) Mining gene expression signature for the detection of pre-malignant melanocytes and early melanomas with risk for metastasis. *PLoS ONE* 7: e44800.

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 324(5929): 930-35.

Tucker MA, Goldstein AM (2003) Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22: 3042-52.

Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J (2011) A melanoma molecular disease model. *PLoS ONE* 6: e18257.

Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews* 13: 227-32.

Walter J (2011) An Epigenetic Tet a Tet with Pluripotency *Cell Stem Cell* 8: 121-122

Williams K, Christensen J, Helin K (2012) DNA Methylation: TET proteins – guardians of CpG islands? *EMBO reports* Vol. 13 n. 1: 28-35.

Wu H, Zhang Y (2011) Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & Development* 25: 2436-52.

Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J-Y, Ma S-H, Liu J, Xu Z-D, Zhu H-G, Ling Z-Q, Ye D, Guan K-L, Xiong Y (2013) Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 32: 663-69.

Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG (2010) TET1 is DNA binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Research* 20: 1390-93.