FLÁVIA CAL SABINO

Modificação dos métodos *Alu*-PCR e AIMS para a identificação de alterações genéticas e epigenéticas em câncer de mama

unesp

1910001279

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Genética

FLÁVIA CAL SABINO

Modificação dos métodos *Alu*-PCR e AIMS para a identificação de alterações genéticas e epigenéticas em câncer de mama

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientador: Profª Drª Cláudia Márcia A. Carareto

São José do Rio Preto - SP

U N E S P **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
Campus de São José do Rio Preto
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
Programa de Pós-Graduação em Genética

FLÁVIA CAL SABINO

Modificação dos métodos *Alu*-PCR e AIMS para a identificação de alterações genéticas e epigenéticas em câncer de mama

Unesp - Inst. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto
T. 1.279/04

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientador: Profª Drª Cláudia Márcia A. Carareto

São José do Rio Preto - SP

†616-006.6
S116m

Sabino, Flávia Cal.
Modificação dos métodos Alu-PCR e AIMS para a identificação de alterações genéticas e epigenéticas em câncer de mama / Flávia Cal Sabino – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004
94 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Carareto, Cláudia Márcia Aparecida
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular. 2.Marcadores biológicos de tumores. 3.Cancer de mama - Aspectos genéticos .4.Variações genéticas - Técnicas de identificação. 5. Variações epigenéticas - Técnicas de identificação. I.Carareto, Cláudia Márcia Aparecida. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.21

FLÁVIA CAL SABINO

MODIFICAÇÃO DOS MÉTODOS *ALU*-PCR E AIMS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM CÂNCER DE MAMA

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientador: .....

2° Examinador .....

3° Examinador .....

São José do Rio Preto, ____/_____/_____.

Aos meus pais

Agradecimentos

À minha orientadora, Cláudia Carareto, por todos esses anos de orientação, pela confiança e enorme paciência e por estar sempre pronta a me atender quando precisei. Agradeço por tudo que aprendi, principalmente a ética e a seriedade que devemos ter nessa profissão.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas por todos os momentos que passei aqui durante esses sete anos.

Aos professores da Pós-graduação em Genética que me ensinaram muito, dentro e fora das salas de aula.

À Professora Doutora Eloiza Tajara pela colaboração na implantação da técnica de AIMS modificada.

Aos funcionários da Universidade, em especial ao técnico Josué, a enfermeira Kikue e a secretária da seção de pós-graduação Rosana.

À todas as "minhas" pacientes, pois sem elas este trabalho não poderia ser realizado.

Às equipes médicas da Unidade de Oncologia Ginecológica e Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, principalmente ao Dr. Newton Bordin, do Serviço de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia, principalmente ao Dr. Roberto Bozolla, e a Drª Patrícia Cury do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FAMERP-FUNFARME de São José do Rio Preto.

As enfermeiras do Centro Cirúrgico, especialmente a Neusa e a Adriana e as enfermeiras do 4º andar do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, principalmente a Ana Paula.

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Evolução Molecular Luciane, Juliana e Nathalia que sempre estiveram comigo me incentivando, me ajudando e me ensinando muito. Agradeço também pelas horas agradáveis e pelas boas gargalhadas que tivemos no laboratório e fora dele.

Aos meus amigos que estão ao meu lado desde a graduação e que eu guardo um enorme carinho, especialmente a Cássia, a Karina, ao Luís Gustavo e Maria Paula.

Ao Ulisses pela amizade e por sempre ter me socorrido nas horas de desespero no trabalho.

Aos meus amigos Paula, Luciane, Marcelo, Nathalia, Juliana, Karina, Joaquim, Flávia e Maurício pelas risadas, brincadeiras e momentos de descontração na hora do almoço.

À minha amiga Paula pelas conversas e "desabafos" durante o horário de almoço.

Ao amigo Adriano Mondini, pelas longas conversas e pelo incentivo, depois das aulas de inglês.

À minha família por ser tão especial e que está sempre ao meu lado me incentivando e acreditando em mim, especialmente ao meu irmão Fábio, que mesmo de longe, sempre me animou com sua alegria constante e aos meus pais que estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida e com quem eu sempre pude contar e compartilhar todas as alegrias, vitórias, tristezas e derrotas e sempre tirando um aprendizado dessas situações.

À Deus e a todos que acreditaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Introdução	8
Instabilidade genética como marcador molecular	10
Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)	11
Inter-simple sequence repeat PCR (INTER-SSR-PCR)	12
Estado de metilação como marcador molecular	12
Seqüenciamento bissulfito	16
Restriction landmark genomic screening (RLGS)	17
Identification de CpG islands exhibiting altered methylation patterns (ICEAMP)	18
Methylation-specific PCR (MSP)	18
M-sensitive arbitrarily primed PCR (MS-AP-PCR)	19
Methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SnuPE)	20
Combined bisulfite restriction analysis (COBRA)	21
Methylated CpG island amplification (MCA)	22
Amplification of inter-methylated sites (AIMS)	23
Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR (BS-MSP)	25
Bisulfite convertion-specific restriction analysis (BCORA)	25
Elementos transponíveis como marcadores moleculares	26
Objetivos	31
Material e Métodos	33
Casuística	33
Metodologia	34
Obtenção das amostras de carcinoma obtido após remoção cirúrgica	34
Extração do DNA genômico	35
Amplificação de sítios inter-metilados (método AIMS)	35
Método *Alu*-PCR	39
Resultados	43
Discussão	62
Conclusões	73
Referências Bibliográficas	75
Resumo	89
Abstract	91

I. Introdução

A transformação de células normais em malignas envolve, tipicamente, a perda de expressão de genes supressores de tumor, a ativação de proto-oncogenes, e defeitos nos mecanismos de reparo de erros, resultantes de acúmulos de alterações genéticas e epigenéticas. Os mecanismos capazes de causar mudanças nas seqüências de DNA incluem substituições, deleções e inserções de pares de bases, recombinações e amplificações de oncogenes, como também, modificações de genes supressores de tumor, de genes envolvidos no ciclo celular ou ainda genes relacionados com metástase e invasão (Sugimura *et al.*, 1992).

Ao contrário das mutações genéticas, os eventos epigenéticos não envolvem mudanças na seqüência de nucleotídeos (Yan *et al.*, 2001) e na estrutura cromossômica (Lengauer *et al.*, 1998). Os dois principais mecanismos de regulação epigenética relacionada à expressão gênica são a metilação da região promotora dos genes e a modificação das histonas, causando mudança na estrutura da cromatina. Considerando que o câncer se desenvolve devido a uma mudança na expressão gênica e que a metilação do DNA controla parcialmente a expressão dos genes pressupõe-se que a metilação aberrante do DNA esteja implicada na tumorigênese (Jones, 1996; Bird,1999). Tem sido mostrado que alterações da metilação global do DNA são encontradas com maior freqüência em muitos tecidos neoplásicos do que em tecidos normais (Counts & Goodman, 1995; Jones & Laird, 1999; Warnecke & Bestor, 2000).

Embora alterações genéticas ou epigenéticas possam resultar em mudanças celulares similares, algumas diferenças significantes podem ser distinguidas entre elas. Enquanto as mutações genéticas são mais freqüentes em cânceres familiares, as alterações epigenéticas ocorrem amplamente em cânceres esporádicos (Catteau & Morris, 2002).

O câncer é responsável por uma grande incidência de óbitos em todo o mundo. No Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte (Instituto Nacional do Câncer – INCA). O Ministério da Saúde estimou para 2003 a ocorrência de 402.190 casos novos e 126.960 óbitos por câncer. Para o sexo masculino, eram esperados 186.155 casos novos e 68.350 óbitos, enquanto que, para o sexo feminino, foram estimados 216.035 casos novos e 58.610 óbitos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

O câncer de mama, entre as mulheres, apresenta-se como a segunda neoplasia maligna mais prevalente no mundo (Parkin *et al.*, 2001), sendo também o segundo tipo de tumor que acomete a população brasileira (INCA). Os números de óbitos e de casos novos estimados para o ano 2003 foram, respectivamente, 9.335 e 41.610.

Os estudos internacionais têm mostrado um aumento global na sobrevida das mulheres com câncer de mama, principalmente para os casos em que esta doença se encontra em estágios clínicos iniciais; contudo, apesar de ser considerado como um câncer de prognóstico relativamente bom, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estádios avançados. Em face dos dados disponíveis de registros hospitalares, 60% dos tumores de mama, em média, são diagnosticados em estádio III ou IV (INCA). Investimentos tecnológicos e em recursos humanos, no âmbito de um programa estruturado para detecção precoce dessa neoplasia, bem como a implementação de um sistema nacional de informações, constituem estratégias importantes no sentido de reverter esse cenário.

Os primeiros sinais do câncer, usualmente, vêm de uma ou mais das seguintes fontes: presença de sintomas, apalpação ou detecção visual, análise histopatológica de um espécime de biópsia, imagem remota ou detecção de um biomarcador em um tecido ou espécime do fluido corporal. Os biomarcadores são a melhor fonte para a detecção precoce da doença; portanto, é importante o desenvolvimento de alvos moleculares para serem usados como indicadores de diagnóstico e prognóstico (Sanchez-Cespedes *et al.*, 2000). Um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattapalia, 1996).

Avanços recentes nas análises moleculares têm possibilitado a detecção de eventos que são críticos para o processo da tumorigênese. Diversos métodos têm sido desenvolvidos com o propósito de encontrar marcadores moleculares característicos para um tipo específico de câncer, ou mesmo marcadores gerais,



que permitam diagnósticos e prognósticos precoces. A seguir, serão apresentados os principais métodos mais recentes desenvolvidos com essa finalidade.

A. Instabilidade genética como marcador molecular

Numerosas alterações genéticas que afetam genes que controlam o crescimento celular podem ser identificadas em células neoplásicas e fornecem evidências para as bases genéticas do câncer humano (Lengauer *et al.*, 1998). A instabilidade genética associada ao câncer pode envolver alterações cromossômicas, translocações numéricas e amplificações gênicas.

As alterações do número de cromossomos são decorrentes de perdas ou ganhos de cromossomos inteiros, como por exemplo, a perda do cromossomo 10 em glioblastomas, freqüentemente representa a inativação do gene supressor de tumor *PTEN* (Wang *et al.*, 1997). As translocações cromossômicas são detectadas citogeneticamente como fusões de cromossomos diferentes ou de segmentos, normalmente não-contíguos, de um único cromossomo. Um exemplo é o cromossomo Filadélfia em leucemias mielóides agudas, onde a terminação carboxila do gene *c-abl,* no cromossomo 9, está ligada à terminação amino do gene *BCR* no cromossomo 22 (Nowell, 1997). As amplificações gênicas são observadas em nível citogenético como regiões homogeneamente coradas. Como exemplo pode ser citada a amplificação do gene N-*myc* que ocorre em aproximadamente 30% de neuroblastomas avançados (Seeger *et al.*, 1985).

A identificação de um pequeno número de rearranjos citogenéticos únicos em tumores específicos gerou a expectativa de que a caracterização citogenética sistemática do tumor poderia levar ao entendimento das bases da formação deste tumor. No entanto, as ferramentas citogenéticas não foram suficientemente poderosas para atingir esse objetivo (Boland & Ricciardiello, 1999). Novos métodos têm sido desenvolvidos para se atingir esse objetivo, dentre eles, dois são descritos a seguir.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

a) AP-PCR (do Inglês: *Arbitrarily Primed PCR*; Peinado *et al.*, 1992)

O método AP-PCR foi desenvolvido por Peinado *et al.* (1992) para caracterizar alterações genéticas em câncer colorretal, comparando *fingerprints* de tecidos tumoral e normal adjacente ao tumor. A comparação dos produtos da PCR dos tecidos normal e tumoral permite estimar a extensão global de ganhos e perdas genéticas.

Diversos pesquisadores (Ionov *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993) utilizaram o AP-PCR para detectar variações sutis de tamanho nos produtos da PCR em um subconjunto de 12% dos cânceres que não apresentavam ganhos ou perdas cromossômicas. Ionov *et al.* (1993) notaram que esses tumores tinham mutações somáticas em seqüências repetidas simples (microssatélites), tais como mononucleotídeos repetidos (sempre deleções) e dinucleotídeos repetidos (deleções e inserções). Assim, essa via que leva a tumorigênese foi detectada em 12-20% dos tumores, sendo a seguir as bases moleculares desta via definitivamente associada ao sistema de reparo de erros do DNA humano (Peltomaki *et al.*, 1993; Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993).

Tumores com o fenótipo acima descrito são ditos terem instabilidade de microssatélites e são caracterizados por um grande número de mutações em ponto e pelo acúmulo de alterações do comprimento de seqüências repetidas simples. A maioria dessas seqüências ocorre em *introns* e em regiões intergênicas; variações essas que devem ser biologicamente irrelevantes na maioria dos casos. Contudo, têm sido identificado um pequeno número de genes com microssatélites, em regiões codificadoras críticas, nos quais ocorrem inserções e deleções. Estas variações de comprimento criam modificações na estrutura do DNA, levando à inativação da expressão gênica (Boland & Ricciardiello, 1999).

A instabilidade de microssatélites é causada por defeitos da maquinaria de reparo de erros que, além de corrigir nucleotídeos errados, também, repara incisões e deleções em seqüências repetidas de DNA (Breivik & Gaudernack, 1999). Tais padrões de mutações são encontrados em muitos genes estruturais que

participam em vários aspectos da homeostase celular normal em diferentes tipos de tumores (Furmaga *et al.*, 2003).

b) INTER-SSR-PCR (do Inglês: *inter-simple sequence repeat PCR; Basik et al.*, 1997)

O método INTER-SSR-PCR também foi desenvolvido para avaliar o grau de instabilidade genômica. É uma técnica rápida e reprodutível para quantificação de instabilidade genômica observada em tumores esporádicos, manifestada como amplificações, deleções, translocações e inserções. Para a aplicação desse método utiliza-se um *primer* único, homólogo a dinucleotídeos repetidos, e com dois nucleotídeos não-repetitivos na extremidade 3'. A avaliação do grau de instabilidade genômica é deduzida da presença (ganho) ou da ausência (perda) de bandas, quando comparados segmentos amplificados de tecidos neoplásicos e tecidos normais adjacentes.

B. Estado de metilação como marcador molecular

Estamos acostumados com a idéia de que o potencial codificante do genoma depende do arranjo das quatro bases nitrogenadas; no entanto, informações adicionais que afetam o genótipo estão associadas à distribuição da base modificada 5-metilcitosina.

A metilação do DNA é provavelmente universal em vertebrados. Em humanos, aproximadamente 1% das bases do DNA apresenta-se modificada, após a síntese, pela adição de um grupo metil (Kriaucionis & Bird, 2003). No genoma de mamíferos, a metilação ocorre em citosinas que estão localizadas em uma posição 5' de uma guanina, em um dinucleotídeo CpG (Bird, 2002). Este dinucleotídeo é, na verdade, mal representado ao longo do genoma, devido à conversão de citosina metilada em timina via desaminação (Chan *et al.*, 2001; Sved & Bird, 1990); contudo, pequenas regiões de 0,5 até 4 kb de comprimento, conhecidas como ilhas CpG, são ricas em conteúdo CpG (Bird, 2002; Takai &



Jones, 2002). A maior parte dessas ilhas é encontrada próxima das regiões promotoras de quase metade dos genes no genoma de mamíferos e geralmente estão desmetiladas em células normais. A metilação de ilhas CpG representa um importante papel no silenciamento gênico associado ao *imprinting* genômico (Li, 2002) e também à carcinogênese (Jones & Baylin, 2002).

Em câncer, a hipermetilação dessas regiões promotoras é a mudança epigenética melhor caracterizada. Esta mudança é encontrada em todos tipos de neoplasias humana e está associada ao silenciamento transcricional inapropriado dos genes (Baylin & Herman, 2000; Jones & Laird, 1999; Robertson & Jones, 2000).

Tanto a hipermetilação quanto a hipometilação podem contribuir para o processo carcinogênico. A hipermetilação regional pode estar associada à inativação de genes supressores de tumor, enquanto a hipometilação pode estar relacionada a superexpressão de oncogenes. Assim, a evolução do processo epigenético, conseqüentemente, afeta mecanismos tais como o reparo do DNA, o controle do ciclo celular e a apoptose.

Apesar da importância da metilação das ilhas CpG no silenciamento gênico, não é bem compreendido como a ilha inteira de um gene é metilada em células silenciadas. Uma primeira proposição para explicar este fenômeno foi que as ilhas CpG são desmetiladas em células normais, com exceção daquelas associadas aos genes marcados (do Inglês: *imprinted*) e genes do cromossomo X inativado. Atualmente, considera-se que algumas ilhas CpG autossômicas, "não-marcadas", são metiladas em células normais e poderiam, ainda, usar este mecanismo para o controle da expressão gênica (Issa *et al.*, 1994; Ahuja *et al.*, 1998; Futscher *et al.*, 2002; Strichman-Almashanu *et al.*, 2002). No entanto, a maioria dos resíduos de citosina metilados são encontrados em dinucleotídeos CpG que estão localizados fora das ilhas CpG, principalmente em seqüências repetitivas (Yoder *et al.*, 1997).

Ilhas CpG autossômicas em genes não-marcados permanecem desmetiladas no seu estado normal, mas podem se tornar metiladas durante a transformação oncogênica (Antequera *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1990). Isto

demostra que alterações no estado de metilação das ilhas CpG durante a transformação oncogênica estão relacionadas a mudanças transcricionais em genes envolvidos na regulação do crescimento (Merlo *et al.*, 1995; Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995) e outros genes envolvidos no ciclo celular.

Em tecidos não-malignos, a metilação de algumas ilhas CpG aumenta com a idade (Issa *et al.*, 1994; Ahuja *et al.*, 1998), mas o conteúdo genômico total de 5-metilcitosina decresce (Hoal-van Helden & van Helden, 1989). Estes eventos opostos também ocorrem, e são muito mais freqüentes em células neoplásicas (Feinberg & Vogelstein, 1983; Gama-Sosa *et al.*, 1983; Jones & Laird, 1999). Mudanças na metilação do DNA de cânceres específicos, em locos gênicos individuais, têm sido focalizada sobre a hipermetilação das ilhas CpG (Jones & Baylin, 2002; Jones & Laird, 1999; Esteller, 2002; Plass, 2002). A hipermetilação de promotores é tão comum quanto a disrupção clássica de genes supressores de tumor em cânceres humanos. Sabe-se que aproximadamente 50% dos genes que causam formas familiares de câncer, quando mutados na linhagem germinativa, sofrem silenciamento associado a metilação em várias formas esporádicas de câncer. Existe uma lista crescente de genes candidatos a supressores de tumor que são silenciados por hipermetilação do promotor em certos cânceres. Tem-se mostrado que a metilação aberrante de promotores está associada à perda da função gênica, o que pode fornecer uma vantagem seletiva para as células neoplásicas (Jones & Baylin, 2002).

Sabe-se, também, que células tumorais são hipometiladas em comparação às células normais (Feinberg & Vogelstein, 1983; Feinberg *et al.*, 1988). Isto levou a sugestão de que a hipometilação de regiões não-promotoras do DNA e de elementos estruturais tais como DNAs centromérico, pode intensificar a instabilidade genômica.

A perda de metilação durante a tumorigênese pode ser extremamente importante, pois afeta, primeiramente, as seqüências de DNA repetitivo e DNA parasita que normalmente estão metiladas. Um das conseqüências da hipometilação pode ser a expressão indesejada de elementos transponíveis, levando a eventos de transposição (Yoder *et al.*, 1997). Os mecanismos que levam

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

ao desenvolvimento de padrões de metilação genômica alterados em câncer, não são bem compreendidos. Não está claro se a hipometilação global e a hipermetilação regional de ilhas CpG são eventos mecanicamente ligados.

Nos últimos anos, tem ocorrido um grande avanço no entendimento das conseqüências funcionais da metilação do DNA e sua interação com a estrutura da cromatina e a maquinaria transcricional; contudo, ainda não está claro se os padrões de metilação aberrante são a causa dos processos ou um resultado de efeitos secundários, como também ainda é um enigma sobre o que leva os padrões de metilação do DNA a sofrerem mudanças em células cancerígenas. De uma perspectiva clínica, mudanças na metilação do DNA em células neoplásicas representa um alvo terapêutico atrativo, pois as alterações epigenéticas são, em princípio, mais prontamente reversíveis que eventos genéticos (Karpf & Jones, 2002). Um exame extensivo das diferenças no ganho e perda de metilação em diferentes estágios do desenvolvimento do câncer pode levar a um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos e fornecer meios adicionais de classificação dos tumores. Em adição, a identificação de ilhas CpG aberrantemente metiladas pode permitir a identificação dos genes que estão inativos durante a progressão do tumor. Finalmente, a identificação de mudanças precoces de metilação poderá fornecer biomarcadores úteis no diagnóstico e no tratamento do câncer.

Com o advento das enzimas sensíveis à metilação, em conjunto com análises de *Southern blot*, foi possível, inicialmente, analisar a metilação do DNA, em locos gênicos específicos, Esta abordagem experimental é confiável, mas incômoda e requer uma quantidade substancial de DNA de alta qualidade. O uso da digestão pós-PCR para resolver essas limitações é propenso a resultados falso-positivos que ocorrem por causa da clivagem enzimática incompleta. Mais recentemente, enzimas sensíveis à metilação têm sido usadas com sucesso nas análises de metilação do genoma inteiro (Laird, 2003).

Perfis de metilação, por outro lado, produzem informações sobre o estado de metilação de muitos sítios no genoma, propiciando uma abordagem única para diagnóstico molecular de todo o genoma. Perfis podem ser construídos usando



medições de dinucleotídeos CpG individuais, como na maioria das técnicas baseadas em enzimas de restrição e em *microarrays* (Costello *et al.*, 2000; Adorjan *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2002), ou podem ser compilados de análises baseadas em MSP, do Inglês: *methylation-specific PCR* (Eads *et al.*, 2001; Esteller *et al.*, 2001; Virmani *et al.*, 2002).

Entretanto, as análises de metilação do DNA sofreram grande avanço com a introdução da técnica de transformação do DNA genômico pelo bissulfito de sódio. As taxas diferenciais em que as citosinas e as 5-metilcitosinas são desaminadas pelo bissulfito de sódio para produzir uracila e timina, respectivamente, são conhecidas há algum tempo, mas, não foi até Frommer *et al.* (1992) mostrarem a utilização desta reação química, em conjunto com amplificação por PCR e seqüenciamento, que o método tornou-se amplamente adotado. Agora, dezenas de diferentes técnicas utilizam essa metodologia.

Muitos métodos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar regiões com metilação anormal bem como identificar genes pela descoberta de ilhas CpG aberrantemente hipermetiladas (Huang *et al.*, 1999; Toyota *et al.*, 1999; Costello *et al.*, 2000; Gonzalgo *et al.*, 1997; Gitan *et al.*, 2002). Dentre elas, as mais utilizadas e aquelas de aplicação mais facilitada são descritas a seguir.

a) Seqüenciamento bissulfito (Frommer *et al.*, 1992)

Esse método de seqüenciamento genômico identifica resíduos de 5-metilcitosina e produz seqüências específicas de uma fita única do DNA genômico. O método utiliza a modificação do DNA genômico com bissulfito de sódio, na qual as citosinas são convertidas em uracilas, mas as 5-metilcitosinas permanecem como citosinas (Shapiro *et al.*, 1973; Hayatsu, 1976; Wang *et al.*, 1980). Por isso, a reação bissulfito produz seqüências em que as fitas de DNA opostas não são complementares. A seqüência sob investigação é então amplificada por PCR com dois conjuntos de *primers* específicos para uma das fitas de DNA, de modo a produzir um par de fragmentos, um de cada fita, em que todos os resíduos de uracila e timina são amplificados como timina e apenas

resíduos 5-metilcitosina são amplificados como citosinas. O procedimento produz uma seqüência e um padrão de metilação específico para cada fita do DNA genômico original. Se os produtos da PCR do DNA tratado com bissulfito são clonados e os clones individuais são seqüenciados, as seqüências fornecerão mapas de metilação de uma fita única de DNA. Alternativamente, os produtos da PCR podem ser seqüenciados diretamente para obter uma média da população para cada fita. Em ambos os casos, a posição de cada 5-metilcitosina será obtida.

As maiores vantagens do seqüenciamento bissulfito é que o método fornece a identificação positiva e a localização da 5-metilcitosina e tem a capacidade para gerar dados de seqüências para as fitas individuais de moléculas de DNA.

b) RLGS (do Inglês: *restriction landmark genomic screening*; Kawai *et al.*, 1993)

Esse é um método robusto para a detecção sistemática de metilação do DNA e permite que grande quantidade de locos possa ser investigada ao mesmo tempo, independente da expressão gênica. Foi proposto para detectar genes nos quais o estado de metilação do DNA muda durante o desenvolvimento de um organismo. Nesta abordagem, o DNA genômico é digerido com enzimas de restrição sensíveis à metilação, tais como *Not*1, que reconhece seqüências ricas em CpG. O DNA digerido é, então, eletroforizado em duas dimensões. A presença ou ausência de pontos no gel está associada à condição de metilação. DNA metilado que escapa da digestão é detectado como ausência de um ponto no RLGS. Entretanto, não se pode excluir completamente a possibilidade de que mutações ou recombinações possam causar mudanças na presença de pontos.

O RLGS pode ser aplicado na detecção de DNA amplificado, em câncer (Hirotsune *et al.*, 1992); no mapeamento gênico (Hayashizaki *et al.*, 1992; Chapman *et al.*, 1992) e para analisar padrões de metilação tecido-específicos (Hayashizaki *et al.*, 1993). Embora o RLGS permita aos pesquisadores detectarem um grande número de ilhas CpG, essas, algumas vezes, não estão nas regiões



promotora dos genes e provavelmente não estão envolvidas com a regulação transcricional (Costello *et al.*, 2000).

c) ICEAMP (do Inglês: *identification de CpG islands exhibiting altered methylation patterns*; Cross *et al.*, 1994)

Esse método permite identificar regiões genômicas como uma conseqüência de alteração de metilação durante a tumorigênese. Identifica ilhas CpG que apresentam padrões de metilação alterados permitindo, assim, isolar seqüências ricas em CG metiladas específicas do tumor. Uma coluna com um MBD (do Inglês: *methyl-CpG binding domain*) isola seqüências ricas em CpG de tumores e tecidos adjacentes normais. Em baixa concentração salina, todo o DNA se liga à coluna; no entanto, sob condições de aumento da concentração salina, apenas seqüências densamente metiladas permaneceram ligadas, permitindo, assim, o isolamento. Hibridização substrativa subseqüente remove seqüências comuns a ambos os tecidos, deixando apenas seqüências metiladas únicas do tumor. Usando este método, ilhas CpG e outras regiões ricas em CG podem ser isoladas, clonadas e analisadas.

O método permite a identificação de mudanças de metilação do DNA, que ocorrem durante a progressão do tumor, sem o conhecimento prévio das seqüências envolvidas ou de sítios de enzimas de restrição nestas seqüências. Possibilita uma identificação compreensível de mudanças de metilação durante a tumorigênese e levar a um melhor entendimento dos processos envolvidos.

d) MSP (do Inglês: *methylation-specific PCR*; Herman *et al.*, 1996)

O MSP é um método que permite avaliar rapidamente o estado de metilação de, virtualmente, qualquer grupo de sítios CpG dentro de uma ilha CpG, independente do uso de enzimas de restrição sensíveis à metilação. O método pode ser usado para identificar mudanças de hipermetilação em regiões promotoras associadas com a inativação transcricional de um gene. Este método é

sensível e específico para metilação de qualquer bloco de sítios CpG em uma ilha CpG. Os *primers* são desenhados para distinguirem DNA metilado de DNA não-metilado no DNA modificado pelo bissulfito.

Seqüências de *primers* são escolhidas fora de regiões contendo citosinas freqüentes (para a distinção de DNA não-modificado do modificado) e pares CpG próximos a extremidade 3' dos *primers* (para melhorar a discriminação máxima na PCR entre DNA metilado e não-metilado). Como as duas fitas de DNA não são complementares após o tratamento, podem ser desenhados *primers* para cada fita modificada. É feita uma digestão enzimática inicial do DNA, pois os fragmentos a serem amplificados devem ser intencionalmente pequenos, para permitir a avaliação de padrões de metilação em uma região limitada e para facilitar a aplicação do método para amostras, tais como blocos de parafinas, onde a amplificação de fragmentos grandes não é possível.

O MSP requer pequenas quantidades de DNA e é sensível para 0,1% de alelos metilados de uma dada ilha CpG em um loco. Pode ser realizado em amostras de DNA extraídas de emblocados em parafina e elimina os resultados falso-positivos inerentes às abordagens baseadas em PCR com clivagem diferencial por endonucleases para distinguir DNA metilado de DNA não metilado. É marcantemente mais sensível que as análises de *Southern blot*, facilitando a detecção de baixos números de alelos metilados e o estudo de pequenas amostras. Ainda, permite a análise de todos os sítios CpG, não apenas daqueles dentro de seqüências reconhecidas pelas enzimas de restrição sensíveis à metilação, é muito mais simples e requer menor tempo que o seqüenciamento genômico, como também não utiliza reagentes caros nem radioatividade.

e) MS-AP-PCR (do Inglês: *methylation-sensitive arbitrarily primed PCR*; Gonzalgo *et al.*, 1997)

A limitação fundamental do seqüenciamento genômico e da análise de metilação, baseadas em PCR, é que esses métodos requerem algum conhecimento da seqüência de DNA a ser estudada. Nenhum desses métodos, no entanto, pode

ser usado para isolar seqüências de DNA específicas e desconhecidas de DNAs genômico que estão diferencialmente metiladas entre tecidos normal e tumor.

O AP-PCR foi usado, previamente, para identificar mudanças genéticas incluindo perda de heterozigosidade e ganho cromossômico em tumores coloretais (Welsh & McClelland, 1990; Peinado *et al.*, 1992). Gonzalgo *et al.* (1997) desenvolveram um método AP-PCR sensível à metilação que utiliza digestão com enzimas sensíveis à metilação junto com o AP-PCR para identificar mudanças de metilação específicas, mas casuais em vários sítios no DNA genômico de um modo rápido e eficiente.

O MS-AP-PCR é um método simples e com reprodutibilidade de *fingerprints* para investigação de regiões do genoma que têm padrões de metilação do DNA alterados associados com transformação oncogênica. Pode ser usado para investigar padrões de metilação alterados no DNA genômico e para isolar seqüências específicas associadas a essas mudanças.

Reprodutibilidade e artefatos são importantes quando se trata de qualquer teste baseado em PCR. Por isso, muitos fragmentos de DNA diferentes podem ser gerados por MS-AP-PCR, sendo crítico determinar quais espécies resultaram de mudanças de metilação verdadeiras. O uso de uma enzima de restrição sensível à metilação com um isoesquizômero é importante para controlar a presença de fragmentos não relacionados com mudanças de metilação. O MS-AP-PCR também pode ser usado para a identificação de ilhas CpG originais que podem tornar diferencialmente metiladas durante a tumorigênese.

f) Ms-SnuPE (do Inglês: *methylation-sensitive single nucleotide primer extension*; Gonzalgo & Jones, 1997)

É um método rápido e quantitativo que permite determinar o estado de metilação de múltiplos sítios CpG em várias amostras de DNA. Avalia diferenças de metilação, em sítios CpG específicos, baseado em tratamento bissulfito do DNA, seguido por extensão com *primer* de nucleotídeo único. O DNA genômico é tratado com bissulfito de sódio seguido por PCR da seqüência-alvo para gerar

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

templates para análise de metilação da fita *sense*. A metilação da fita *antisense* também pode ser avaliada pelo desenho de *primers* apropriados para *templates* específicos para esta fita.

A quantificação da proporção de citosinas metiladas e não-metiladas (C versus T) nos sítios CpG originais pode ser facilmente determinada pela incubação do produto da PCR isolados de gel, *primer* (s), taq DNA polimerase, e dCTP ou dTTP marcados, seguidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante e análise por fósforo-imagem. Na fita oposta, *primers* Ms-SnuPE também podem ser determinados com a incorporação de dATP ou dGTP marcados para avaliar o estado de metilação dependendo sobre qual sítios CpG é analisado. A intensidade das bandas nas lacunas C é proporcional a porcentagem de metilação em cada sítio CpG monitorado e a intensidade das bandas nas lacunas T é proporcional a porcentagem de citosinas não-metiladas.

O Ms-SnuPE tem sido utilizado para a detecção de mutações gênicas (Kuppuswamy *et al.*, 1991) e quantificação de expressão específica do alelo (Szabo & Mann, 1995; Singer-Sam *et al.*, 1992; Greenwood & Burke, 1996). Possui muitas vantagens sobre os métodos existentes usados na detecção de mudanças de metilação por que utiliza pequenas quantidades de DNA, incluindo de secções de microdissecados e não utiliza enzimas de restrição para determinar o estado de metilação nos sítios CpG. Além disso, muitos sítios CpG podem ser analisados em cada reação de extensão de *primer* com o uso de uma estratégia de múltiplos *primers*.

g) COBRA (do Inglês: *combined bisulfite restriction analysis*; Xiong & Laird, 1997)

Esse é um método quantitativo que determina os níveis de metilação em um loco gênico específico. Diferenças, na seqüência, que dependem do estado de metilação são introduzidas no DNA genômico pelo tratamento do bissulfito de sódio. A conversão da seqüência pode levar, dependendo da metilação, à criação de novos sítios de enzimas de restrição (Sadri & Hornsby, 1996) ou à retenção de

sítios pré-existentes. Os *primers* são desenhados para serem complementares à seqüência de DNA convertida, mas não possuem dinucleotídeos CpG na região correspondente do DNA original não convertido. Para assegurar a digestão completa dos produtos da PCR, as amostras são purificadas com 10K MWCO *nanospin plus filters* (Gelman Sciences). Os produtos da PCR purificados são digeridos com enzimas de restrição que reconhecem seqüências contendo CpG no DNA original não-convertido. A clivagem irá ocorrer apenas se as seqüências CpG foi mantida durante a conversão. Tanto enzimas sensíveis à metilação, que digerem sítios que estão metilados, como enzimas, que digerem sítios não-metilados podem ser usadas, podendo, até mesmo, uma servir de controle para outra.

O COBRA combina poderosas características como o fácil uso, a acurácia quantitativa e a compatibilidade com secções de parafina. O DNA é tratado com bissulfito de sódio e depois é realizada uma PCR com *primers* específicos para um determinado gene. A digestão dos produtos da PCR com enzimas de restrição sensíveis à metilação mostra as diferenças nas seqüências amplificadas dependendo do estado de metilação. Os níveis de metilação, na amostra de DNA original, são representados pela quantidade relativa de produto da PCR digerido e não-digerido em um modo linearmente quantitativo por meio de um amplo espectro de níveis de metilação do DNA.

h) MCA (do Inglês: *methylated CpG island amplification*; Toyota *et al*., 1999)

Esse método permite análises de metilação e o isolamento de ilhas CpG diferencialmente metiladas em tecidos tumorais e normais. O MCA possibilita, pela eficiência da amplificação por PCR de ilhas CpG metiladas, a detecção da metilação de muitos genes.

Primeiramente, o DNA genômico é digerido com uma enzima de restrição sensível à metilação, que não digere sítios CCCGGG quando metilados, como a endonuclease *Sma*I, deixando o fragmentos com extremidades cegas. Os sítios CCCGGG metilados são digeridos com um isoesquisômero da enzima utilizada

anteriormente (*Xma*I), deixando fragmentos com extremidades coesivas. Adaptadores são ligados a essas extremidades coesivas e, então, é realizada uma PCR para amplificar as seqüências metiladas.

Após a PCR, os amplificados são sujeitos a RDA (do Inglês: *representational difference analysis*), que explora as diferenças entre sítios de restrição sensíveis à metilação entre o DNA de células tumorais e normais, através de um passo hibridização substrativa comparativa. As vantagens dessa abordagem são muito similares às da RLGS. Entretanto, ainda que muitas das ilhas CpG estejam associadas com genes, definindo o sítio de início de um gene, a relação exata da ilha para a regulação transcricional de um gene pode ser laboriosa.

O método MCA pode ser útil para a determinação, relativamente rápida, do estado de metilação de um grande número de amostras em múltiplos locos. E pela otimização das condições da PCR, deveria ser facilmente adaptada para o estudo do estado de metilação de qualquer gene que tenha dois sítios CCCGGG proximamente espaçados. Dentre as desvantagens do MCA em relação a outros métodos destacam-se que permite examinar apenas um número limitado de sítios CpG em uma ilha CpG e é sensível à digestão incompleta usando a enzima sensível à metilação *Sma*I. No entanto, muitos passos no MCA são corrigidos por automação, e por permitir a análise de múltiplos genes relativamente rápido, este método pode ter aplicações importantes em estudos baseados em populações de ilhas CpG metiladas.

i) AIMS (do Inglês: *amplification of inter-methylated sites*; Frigola *et al.*, 2002)

O método de AIMS é baseado na clivagem diferencial de isoesquizômeros com sensibilidade distinta à metilação. Adaptadores específicos são ligados nas extremidades metiladas de DNA genômico digerido, como no MCA. As seqüências ligadas são amplificadas por PCR usando-se *primers*, específicos para os adaptadores, com dois a quatro resíduos de dinucleotídeos, escolhidos arbitrariamente, na extremidade 3' para, assim, reduzir a complexidade do produto. Múltiplas bandas anônimas, representando seqüências de DNA

flanqueadas por dois sítios metilados, podem ser isoladas e individualmente caracterizadas. A comparação de *fingerprints* obtidos de tecido normal e de tecido neoplásico revela alterações específicas do tumor que são marcadores da doença estudada e inclui hipo e hipermetilações específicas do tumor.

Isso permite investigar alterações e fazer uma avaliação global do estado de metilação de células neoplásicas. É uma modificação do método MCA idealizada para gerar *fingerprints* de fácil leitura que representam o perfil de metilação das células. Permite a identificação de seqüências hipometiladas (perda de uma banda) e hipermetiladas (aparecimento de uma nova banda) e tem sido aplicado em análises de metilação diferencial de tecido tumoral pareado ao tecido adjacente normal, bem como em linhagens celulares tumorais. Para ser amplificada, a seqüência deve ter dois requisitos: (i) conter dois sítios metilados proximamente espaçados e (ii) mostrar homologia a nucleotídeos arbitrários presentes na extremidade 3' do *primer*.

O aparecimento de uma banda na amostra de tumor, mas não na do tecido normal é interpretado como indício de hipermetilação. Decréscimo relativo na intensidade de uma banda no tumor, quando comparados com o *fingerprint* do tecido normal adjacente, é considerado como indício de hipometilação. Perda de homólogos e amplificação gênica também podem produzir mudanças dramáticas na exibição de uma banda. Portanto, esta possibilidade, embora incomum, deve ser considerada na interpretação da representação diferencial.

O método de AIMS possui duas propriedades importantes: a geração de um alto número de seqüências representando duas ilhas CpG próximas e a possibilidade de reduzir a complexidade do produto para obter *fingerprints* legíveis. Os *primers* que oferecem os *fingerprints* mais legíveis são aqueles que contêm três ou quatro dinucleotídeos aleatórios na extremidade 3' e quando são utilizados em pares. Assumindo o pareamento perfeito, cada nucleotídeo adicional implica em uma redução de complexidade, mas para alguns pontos, mesmo com o uso de condições muito estringentes, é provável que o AIMS se comporte como o AP-PCR (Welsh & McClelland, 1990); desse modo, qualquer grau de

flexibilidade na temperatura durante os ciclos iniciais da PCR pode permitir a amplificação de um número de seqüências maior que o esperado.

A aplicação do método de AIMS para uma grande série de amostras parece viável por causa da simplicidade da técnica e o baixo requisito de material inicial. O método é especialmente poderoso na detecção de seqüências hipermetiladas, que são freqüentemente associadas com a inativação de genes supressores de tumor (Jones & Laird, 1999; Baylin *et al.*, 1998). Hipometilações, também são detectadas embora a contaminação com células mantendo o estado de metilação pode limitar a sensibilidade para aproximadamente 10%.

j) BS-MSP (do Inglês: *bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR*; Sasaki *et al.*, 2003)

Método sensível para avaliar precisamente o estado de metilação de dinucleotídeos CpG. Esse método consiste de dois passos de amplificação por PCR após a transformação pelo bissulfito de sódio. Durante a primeira amplificação utiliza-se um conjunto de *primers* que não contém nenhum dinucleotídeo CpG em sua seqüência mas que possui muitas citosinas, portanto, apenas seqüências de DNA fortemente convertidas pelo bissulfito de sódio serão amplificadas eliminando seqüências de DNA, não convertidas pelo bissulfito de sódio, e evita uma superestimação do nível de metilação do DNA. Um segundo passo utiliza dois conjuntos de *primers*, que contêm muitas citosinas de regiões com dinucleotídeos CpG, específicos para seqüências metiladas e não-metiladas. O BS-MSP é um método útil para análises rotineiras de espécimes de tumores clínicos que foram embebidos em parafina e microdissecados.

l) BCORA (do inglês: *bisulfite convertion-specific restriction analysis*; Sasaki *et al.*, 2003)

O método BCORA consiste de um tratamento bissulfito comum seguido por digestão com enzimas de restrição específicas para a conversão e

quantificação do DNA modificado pelo bissulfito de sódio. Durante o primeiro passo, *primers* do MSP se anelam às seqüências completamente convertidas no DNA modificado pelo bissulfito. Os produtos do MSP são digeridos com uma enzima de restrição que reconhecem seqüências contendo timinas convertidas de citosinas de regiões não-CpG. A digestão ocorre apenas quando as citosinas de regiões não-CpG são completamente convertidas em timinas durante a modificação bissulfito. A enzima de restrição *Apo*I é muito utilizada e reconhece PuAATTPy como sítio de restrição; uma vez que a conversão é incompleta, este sítio não-convertido (PuAACCPy) não é digerido por esta enzima. A porcentagem de citosinas completamente convertidas em uma amostra de DNA genômico pode ser calculada através da taxa de digestão dos produtos da PCR pela enzima e a quantidade total de produtos da PCR. Assim, com a utilização do BCORA, o estado de conversão pela modificação com bissulfito de sódio é quantitativamente avaliado.

C. Elementos transponíveis como marcadores moleculares

Um marcador ideal não precisa, necessariamente, ser específico para um único tipo de tumor, mas pode ser universal na sua habilidade para detectar, como um perfil, alterações genéticas (Furmaga *et al.*, 2003). Os elementos transponíveis podem ser ferramentas úteis em análises de alterações genéticas do DNA genômico. Cerca de 47% do genoma humano é constituída por elementos transponíveis; destes, duas grandes superfamílias SINE (13%) e LINE (21%) são as principais.

De maneira geral, os principais efeitos destas seqüências móveis nos genomas ocorrem na estrutura cromossômica e na organização dos genes. Tais eventos são freqüentemente deletérios e decorrem, principalmente, de mutações, causadas pela sua inserção ou pelo transporte de seqüências do DNA hospedeiro quando se deslocam de um local para outro, e de deleções e duplicações de seqüências, resultantes da recombinação homóloga entre duas de suas cópias (revisão em Carareto *et al.*, 2001).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

Line-1 é o elemento LINE (do Inglês: *Long Interspersed Nuclear Elements*) mais comum dentre os presentes no genoma humano. Seu número de cópias excede a 100 mil (Burton *et al.*, 1986; Hwu *et al.*, 1986; Hutchinson *et al.*, 1989); destes, cerca de 3.500 são completos (Adams *et al.*, 1980; Singer *et al.*, 1983), mas apenas 30 a 60 devem ser ativos (Sassaman *et al.*, 1997). Os elementos completos têm cerca de 6 kb e são constituídos por duas *open reading frames* (ORFs); a ORF1 codifica a proteína p40, de função desconhecida, mas que têm sido detectada em maior quantidade em linhagens celulares de tecidos neoplásicos do que de tecidos normais (Alves *et al.*, 1996), enquanto a ORF2 codifica uma transcriptase reversa (Mathias *et al.*, 1991) e uma RNase (Feng *et al.*, 1996). Sua região promotora é constituída de 903 nucleotídeos e constitui uma ilha CpG (Becker *et al.*, 1993).

O elemento *Line*-1 tem despertado grande interesse porque suas inserções têm sido associadas a doenças genéticas, via mutações nas linhagens germinativas ou na somática (revisão em Kazazian, 1998 e Carareto *et al.*, 2001). Hata & Sakaki (1997) mostraram que a metilação do DNA inibe a transcrição de *Line*-1 *in vivo* e *in vitro*. Tem sido mostrado, também, que hipometilação de elementos *Line*-1 ou seqüências ao redor do elemento pode ser importante na transformação maligna (Bernardino *et al.*, 1997; Florl *et al.*, 1999).

Os elementos *Alu* são os SINEs (do inglês: *Short Interspersed Nuclear Elements*) mais numerosos no genoma humano, alcançando um número de cópia superior a 1 milhão (Batzer & Deininger, 2002). Essas seqüências consistem de unidades de aproximadamente 300 pb, com uma distância média de 4 kb entre uma cópia e outra. Quando sua inserção ocorre em regiões codificadoras ou próxima a elas, podem desencadear doenças humanas. Se inseridos em *exons* ou nos limites *exons-introns*, podem modificar diretamente a seqüência do RNA ou o seu processamento durante a retirada dos *introns*. Quando envolvidos em recombinação entre cromossomos homólogos, levam a deleções e duplicações gênicas ou a translocações e rearranjos cromossômicos complexos. Deininger & Blatzer (1999) compilaram da literatura mais de 50 casos de doenças decorrentes



de inserção e recombinação do elemento *Alu* e estimaram que esses eventos são responsáveis por 0,1% e 0,3% das doenças genéticas humanas, respectivamente.

Alguns métodos têm sido utilizados para verificar a influência dos elementos *Line*-1 e *Alu* na origem de doenças humanas. Muitos pesquisadores utilizaram as técnicas de *Southern Blot* e *Northern Blot* com o objetivo de avaliar o estado de atividade dos elementos *Line*-1 em determinado tipo de tumor. Thayer *et al.* (1993) mostraram que linhagens celulares de tumores e de células normais, e amostras de teratocarcinoma, carcinoma de mama e meduloblastoma apresentaram grande quantidade da proteína p40.

Também tem sido muito estudado o grau de metilação dos elementos transponíveis em vários tipos de cânceres (Jürgens *et al.*, 1996; Woodcock *et al.*, 1997; Florl *et al.*, 1999). Muitos dos métodos utilizados para avaliar o estado de metilação de uma determinada seqüência, como o seqüenciamento bissulfito (Frommer *et al.*, 1992), o COBRA (Xiong & Laird, 1997), o MSP (Herman *et al.*, 1996), também foram aplicados para avaliar o estado de metilação do *Line*-1, principalmente de sua região promotora.

A presença universal de elementos *Alu* repetidos em todo o genoma pode permitir a detecção, não-específica, de inserções e deleções de muitas seqüências genéticas localizadas entre duas seqüências *Alu* (Strout *et al.*, 1998; Weichenrieder *et al.*, 2001; Suminaga *et al.*, 2000; Stenger *et al.*, 2001; Rowold & Herrera, 2000). Esses ganhos ou perdas de material genômico poderiam representar seqüências gênicas, grandes ou pequenas, associadas com LOH e/ou amplificação gênica.

Tsongalis *et al.* (1993) propuseram a utilização de uma PCR para seqüências das repetições terminais do elemento *Alu* (*Alu*-PCR) como uma forma de detectar alterações genômicas novas sem o conhecimento das seqüências alteradas. Como os elementos *Alu* podem estar inseridos em sentidos opostos em uma seqüência de DNA, Furmaga *et al.* (2003) propuseram a utilização de PCRs com apenas um *primer* para detectar alterações genéticas em células neoplásicas. Desse modo, são amplificadas seqüências localizadas entre dois elementos *Alu*, produzindo um padrão de bandas desconhecidas em um gel de poliacrilamida



corado com brometo de etídeo, referido como perfil *Alu*. A presença ou ausência de seqüências de DNA amplificadas pelo *Alu*-PCR pode representar inserções ou deleções de seqüências, respectivamente, tais como oncogenes amplificados ou perda de genes supressores de tumor.

Por ser um método muito sensível, o *Alu*-PCR é adequado, também, para amostras com baixas concentrações de DNA, tais como tecidos embebidos em parafina. Como o perfil *Alu* gerado ressalta múltiplas mudanças em um genoma de célula neoplásicas, comparado ao tecido normal, a interpretação dos resultados é baseada na comparação dos padrões de bandas ao invés de análises de bandas únicas como em PCR convencional de microssatélites. Esta técnica foi utilizada com sucesso para identificar alterações genéticas em carcinoma primário de pulmão e metástase, comparados ao tecido normal conservados em blocos de parafina (Furmaga *et al.*, 2003) e carcinóides de pulmão e de intestino que são histologicamente similares (Furmaga *et al.*, 2004).

II. Objetivos

Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar a utilização de dois métodos de identificação de marcadores moleculares, em condições modificadas das propostas por seus autores, em amostras de câncer de mama e tecidos normais. Os objetivos específicos foram os seguintes:

1) testar a utilização do método de AIMS com dATPs não-marcados com isótopos radioativos, de modo a permitir sua utilização em laboratórios que não tenham licença para utilizar este tipo de material;

2) detectar padrões alterados de metilação em tumores de mama, por meio do método modificado de AIMS, a partir de amostras conservadas em blocos de parafina;

3) investigar a aplicação do método *Alu*-PCR, utilizando gel de poliacrilamida corado com prata, para identificar a ocorrência e a freqüência de alterações genéticas em tumores de mama.

III. Material e Métodos

A. Casuística

Foi utilizado DNA genômico extraído de tecido de carcinoma ductal invasivo de mama e do sangue de mulheres submetidas à cirurgia para remoção do tumor, de emblocados de tecidos mamários de mulheres submetidas a procedimentos de diagnóstico, por tratamento por carcinoma ductal *in situ*, bem como, de tecidos normais de mulheres submetidas à cirurgia plástica estética das mamas. As amostras das pacientes foram colhidas por profissionais médicos da Unidade de Oncologia Ginecológica e Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMERP-FUNFARME; do Serviço de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da FAMERP-FUNFARME e do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FAMERP-FUNFARME de São José do Rio Preto. As amostras foram distribuídas em três grupos de estudo, independente de etnias:

Grupo I: amostras de 13 mulheres e um homem, submetidos à cirurgia por carcinoma ductal invasivo de mama, que fizeram a cirurgia por indicação médica. De cada paciente foi obtida uma amostra do tumor, uma amostra de tecido adjacente ao tumor e uma de sangue periférico;

Grupo II: amostras de seis mulheres submetidas à biópsia estereotáxica por agulha. Os tecidos de carcinoma ductal invasivo de mama e de tecido adjacente de uma mesma paciente foram obtidos de amostras conservadas em blocos de parafina do material de arquivo do Serviço de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto;

Grupo III: amostras de três mulheres que realizaram cirurgia plástica estética de mama normal. De cada paciente foi obtida uma amostra de tecido mamário.

As amostras dos grupos I e III foram doadas com o consentimento livre e esclarecido de todos participantes. Os termos de Consentimento Livre e Esclarecido foram obtidos pela pesquisadora responsável, que esclarecia durante a

entrevista quaisquer dúvida a respeito do projeto. O consentimento foi dado por escrito, contendo todas as informações necessárias e as pacientes não foram, em nenhum momento, forçadas a participarem desta pesquisa. Esta pesquisa não ocasionou qualquer tipo de risco para as participantes, pois foram utilizadas amostras de tecidos que foram encaminhados para exames histopatológicos. O anonimato das participantes foi garantido por codificação das amostras e apenas os pesquisadores envolvidos com o projeto tiveram acesso a eles. As amostras do grupo II foram obtidas dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Como estas amostras foram obtidas em diferentes épocas e tornou-se impraticável contatar as pacientes, foi solicitada, e concedida, a dispensa do termo de consentimento. Entretanto, o anonimato das participantes foi garantido por codificação das amostras e apenas os pesquisadores envolvidos com o projeto tiveram acesso às informações obtidas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNESP de São José do Rio Preto e pelo CONEP (Comitê Nacional de Ética em Pesquisa) sob registro de número 7028.

B. Metodologia

1. Obtenção das amostras de carcinoma obtido após remoção cirúrgica

As amostras de carcinoma obtidas após remoção cirúrgica foram transportadas em tubos de centrífuga de 15 ml esterilizados, contendo 2,5 ml de solução salina de Hanks (8,0 g NaCl; 0,4 g KCl; 47,5 mg Na_2HPO_4; 60,0 mg KH_2PO_4; 1,0 g de glucose; 17,0 mg de vermelho de fenol e água deionizada e autoclavada até completar 1000 ml). As amostras de tumor e de tecido adjacente ao tumor foram colocadas em tubos identificados pela equipe médica da Unidade de Oncologia Ginecológica e Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia logo após a remoção cirúrgica. Estes foram mantidos em geladeira do Centro Cirúrgico e foram coletados até duas horas após a cirurgia. O transporte foi realizado em uma caixa de isopor contendo gelo picado e os tubos, novamente,

foram mantidos em geladeira. A extração do DNA iniciava-se no período da tarde do mesmo dia em que as amostras foram obtidas.

As amostras de sangue periférico foram coletadas das pacientes, por enfermeiras da Unidade de Oncologia Ginecológica e Mastologia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia um dia antes da cirurgia, utilizando tubos esterilizados para coleta de sangue a vácuo, contendo K_3 EDTA (15%); 0,057 ml; 0,34 M.

2. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico dos tecidos mamários foi feita com o kit de extração QIAmp (Qiagen). Inicialmente, o tecido fresco foi cortado em pedaços menores e colocado em tubos de microcentrífuga. Foram adicionados 180 µl de tampão de lise ATL e 20 µl de Proteinase K em todos os tubos. As amostras foram incubadas "overnight", a 56 °C. Após a digestão tecidual, foram adicionados 200 µl de tampão de lise AL, seguindo-se de incubação a 70 °C, durante 10 minutos. O DNA foi precipitado com 200 µl de etanol absoluto, transferido para uma coluna e centrifugado a 8.000 rpm. A seguir, o DNA foi lavado com os tampões AW1 e AW2 e eluído em 200 µl de tampão de eluição (AE).

Os tubos contendo o material emblocado dissecado foram mantidos em banho-maria a 70 °C por 30 minutos com tampão ATL. A seguir, os tubos foram centrifugados, três vezes, durante cinco minutos, a 6.000 rpm. A cada centrifugação, a camada de parafina formada na parede do tudo, acima do tampão, foi retirada com uma ponteira de 200 µl autoclavada. Após a última centrifugação, o DNA foi extraído do mesmo modo que acima descrito.

3. Amplificação de sítios inter-metilados (método AIMS)

Somente as amostras obtidas de tecidos tumorais conservados em blocos de parafina com seus tecidos adjacentes foram utilizadas neste estudo (Tabela I).



Tabela I. Características das amostras de tecidos conservados em parafina, de carcinoma invasivo e tecidos adjacentes, utilizados para a realização do método de AIMS e idade das pacientes.

Indivíduos	Característica do tecido	Idade da paciente
Paciente 1	Carcinoma ductal invasivo, grau III	69
Paciente 2	Carcinoma ductal invasivo, grau III	55
Paciente 3	Carcinoma ductal invasivo, grau III	62
Paciente 4	Carcinoma ductal invasivo, grau II	67
Paciente 5	Carcinoma ductal invasivo, grau III	50
Paciente 6	Carcinoma ductal invasivo, grau III	56

Foram tratados 2ug de DNA genômico com 40U de *Sma*I durante 16 horas, a 30 °C e, a seguir, o DNA digerido foi tratado com 8U de *Xma*I durante 10 horas, a 37°C. As enzimas foram inativadas à temperatura de 65 °C, durante 30 minutos. O DNA foi tratado com 400 µl de solução fenol-clorofórmio e centrifugado durante cinco minutos a 12.000 rpm. Novamente, 400 µl de clorofórmio foram adicionados e outra centrifugação de cinco minutos a 12.000 rpm foi realizada. O DNA foi precipitado com 500 µl de etanol absoluto e 30 µl de acetato de sódio 3M, pH 5,2. Os adaptadores, oligonucleotídeos Blue (5′-ATTCGCAAAGCTCTGA-3′) e MCF (5′-CCGGTCAGAGCTTTGCGAAT-3′), foram incubados a 65°C, durante 2 minutos; a seguir, a solução foi resfriada à temperatura ambiente durante 30-60 min. 2 ug do DNA digerido foi tratado com 2U de T4 DNA ligase e 2 nmol de cada adaptador, purificado com o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) e eluído em 100 µl de H_2O. As seqüências flanqueadas pelos adaptadores foram amplificadas com os *primers* Blue 1 e Blue 2 (*primers* Blue e MCF entendidos com a seqüência CCGGG e mais três nucleotídeos arbitrários):

Blue 1: 5′-ATTCGCAAAGCTCTGAccgggCTG-3′;

Blue 2: 5′-ATTCGCAAAGCTCTGAccgggTGG-3′.

A reação de PCR foi realizada com 2 µl (~ 31 ng), 3 µl (~ 47ng) e 4 µl (~ 62ng) de DNA ligado normal, de tumor e da borda, respectivamente, como *template* em 25µl contendo 1,1µM de cada *primer*, 1U Taq DNA polimerase, 125µM de cada dNTP e tampão PCR (10mM Tris-HCL pH 8,0, 50mM KCL, 1.5mM $MgCl_2$). As reações de PCR foram precedidas por um passo de desnaturação (1 min a 95°C) e terminadas com um passo de extensão (10 mim a 72 °C), com os seguintes parâmetros: 33 ciclos de 15s a 94°C, 1min 15s a 74°C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% em potência constante de 100 V, à temperatura ambiente e em presença de tampão TBE 0,5X (Tris-borato 90mM, pH8.3; EDTA 4mM) durante aproximadamente 6 horas. A Figura 1 apresenta um esquema exemplificando o método de AIMS.

Os géis foram corados com nitrato de prata (Bassam & Caetano-Anollés, 1993). Em uma primeira etapa, cada gel foi fixado em solução fixadora contendo etanol 10% e ácido acético glacial 0,75% durante 9 minutos, sob agitação leve, porém constante. Em seguida, foi realizada a sua coloração por solução de nitrato de prata 0,3% durante 7 minutos, também sob agitação constante. Para retirada do excesso de prata, foram realizadas duas lavagens sucessivas com água destilada, que não ultrapassaram 1 minuto de duração. Por fim, foi adicionada, sob agitação constante, uma solução reveladora, contendo hidróxido de sódio 3% e formaldeído 0,3%, por tempo suficiente para que as bandas pudessem ser visualizadas (em torno de 5 minutos). A seguir, a revelação foi bloqueada com uma lavagem rápida com água destilada. Depois, adicionou-se a solução fixadora inicial deixando em agitação constante durante, aproximadamente, um minuto e mais duas lavagens rápidas foram feitas para bloquear a ação do revelador. Os géis foram secos em papel celofane e glicerol 10%, segundo técnica desenvolvida por Ceron *et al.* (1992).

Foi analisada a reprodutibilidade das bandas em diferentes réplicas da mesma amostra e, também, a presença ou ausência de bandas presentes nas amostras dos tecidos tumorais, da borda do tumor e de tecido normal. Bandas existentes no tumor e não no tecido normal foram interpretadas como



hipermetiladas e bandas com redução de intensidade no tumor ou ausentes como hipometiladas no tecido tumoral.

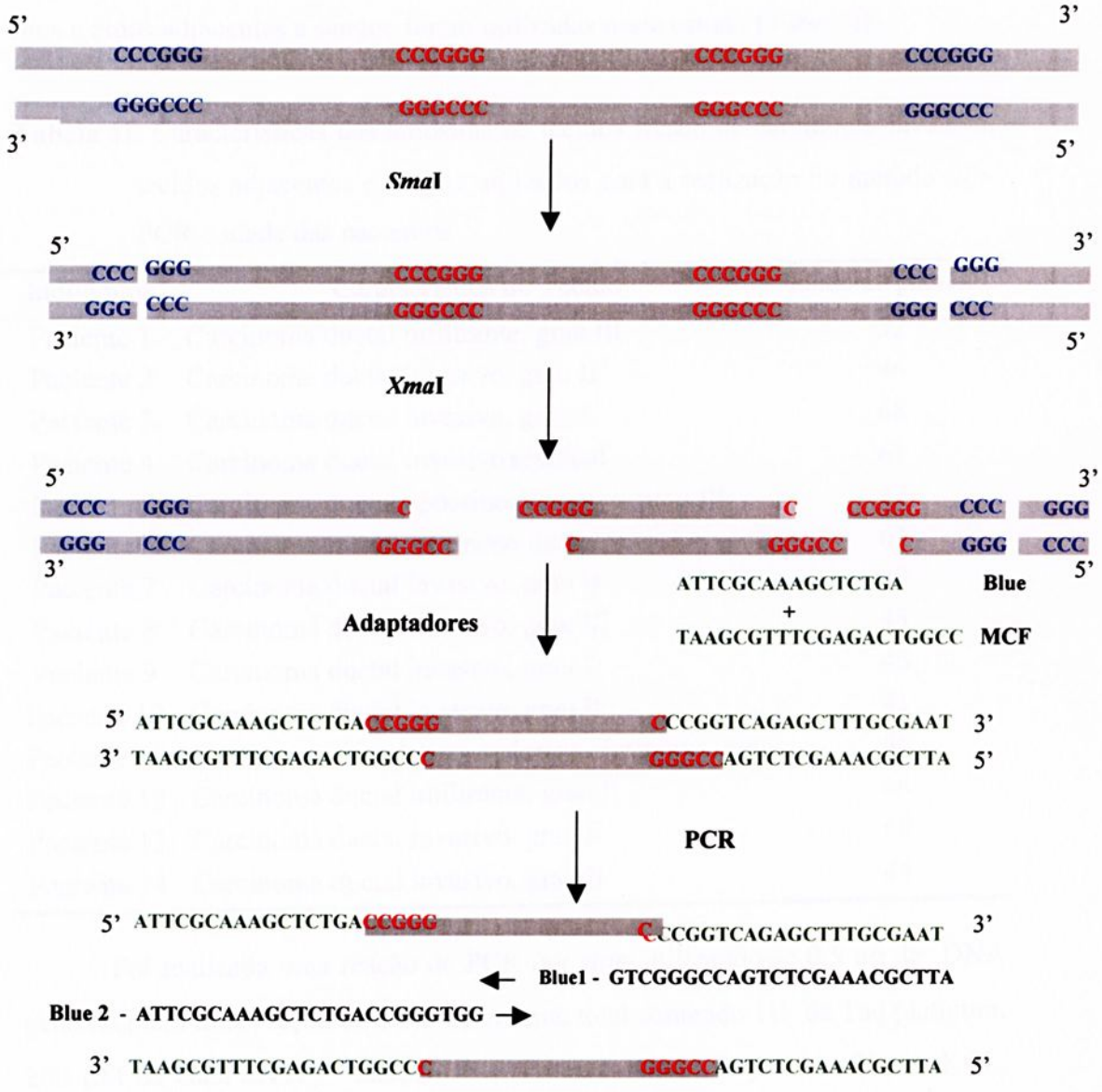


Figura 1. Esquema ilustrativo da técnica de AIMS. O DNA genômico é representado por uma linha sólida cinza com quatro sítios CCCGGG. Os sítios não-metilados (representados em azul) são clivados pela enzima de restrição *Sma*I, formando uma extremidade cega. Os sítios metilados (representados em vermelho) são clivados pela enzima *Xma*I, formando pontas coesivas. Os adaptadores, em verde, se ligam às pontas coesivas. Fragmentos de DNA flanqueados por adaptadores são amplificados por PCR. Os *primers* estão representados em preto.

4. Método *Alu*-PCR

Somente as amostras obtidas de tecido fresco de carcinoma invasivo com seus tecidos adjacentes e sangue foram utilizadas neste estudo (Tabela II).

Tabela II. Características das amostras de tecidos fresco de carcinoma invasivo, tecidos adjacentes e sangue utilizados para a realização do método *Alu*-PCR e idade das pacientes.

Indivíduos	Característica do Tecido	Idade da paciente
Paciente 1	Carcinoma ductal infiltrante, grau III	52
Paciente 2	Carcinoma ductal invasivo, grau II	46
Paciente 3	Carcinoma ductal invasivo, grau I	68
Paciente 4	Carcinoma ductal invasivo residual	61
Paciente 5	Carcinoma ductal apócrino, invasivo, grau III	47
Paciente 6	Carcinoma misto mucinoso ductal invasivo grau	63
Paciente 7	Carcinoma ductal invasivo, grau II	49
Paciente 8	Carcinoma ductal invasivo, grau III	43
Paciente 9	Carcinoma ductal invasivo, grau I	46
Paciente 10	Carcinoma ductal invasivo, grau II	41
Paciente 11	Carcinoma ductal tipo apócrino, invasivo, grau	46
Paciente 12	Carcinoma ductal infiltrante, grau II	66
Paciente 13	Carcinoma ductal invasivo, grau II	60
Paciente 14	Carcinoma ductal invasivo, grau II	44

Foi realizada uma reação de PCR *hot start* utilizando-se 0,5 µg de DNA genômico em uma reação de 25 µl de volume total contendo 1U de Taq platinum, 200 µM de cada dNTP, tampão PCR (10mM Tris-HCL pH 8,0, 50mM KCL, 1.5mM MgCl2) e 40 ng do primer (5'– GGC AGA CTC CAT CTC AAA – 3'). Os parâmetros de ciclagem para o *Alu*-PCR foram os seguintes: desnaturação inicial a 94 °C, durante 12 minutos, seguidos de 40 ciclos consistindo de desnaturação a 94 °C durante 2 minutos, anelamento a 55 °C durante 2 minutos, e extensão a 72 °C durante 3 minutos. A extensão final foi a 72 °C por 10 minutos. Após a PCR, os produtos amplificados foram purificados com o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) e eluídos em 12 µl

de H_20 autoclavada. A Figura 2 apresenta um esquema exemplificando do método *Alu*-PCR.

Os produtos de amplificação purificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 7,5% e corados com nitrato de prata com algumas modificações em relação à descrita no ítem anterior (método de AIMS): (i) a corrida dos produtos da PCR no gel foi realizada, primeiramente, em potência constante de 300 V durante 30 minutos e mais 4 horas em potência constante de 120 V, à temperatura ambiente; (ii) durante a coloração com nitrato de prata cada gel foi primeiramente fixado durante 10 minutos, e em seguida, corado, também, durante10 minutos. A revelação foi realizada por tempo suficiente para que as bandas pudessem ser visualizadas (aproximadamente 15 minutos). Novamente, deixou-se a solução fixadora durante, aproximadamente, 10 minutos.

Foi analisada a reprodutibilidade das bandas em diferentes réplicas da mesma amostra e, também, a presença ou ausência de bandas presentes entre as amostras tumorais, as amostras da borda do tumor e amostras de sangue periférico.

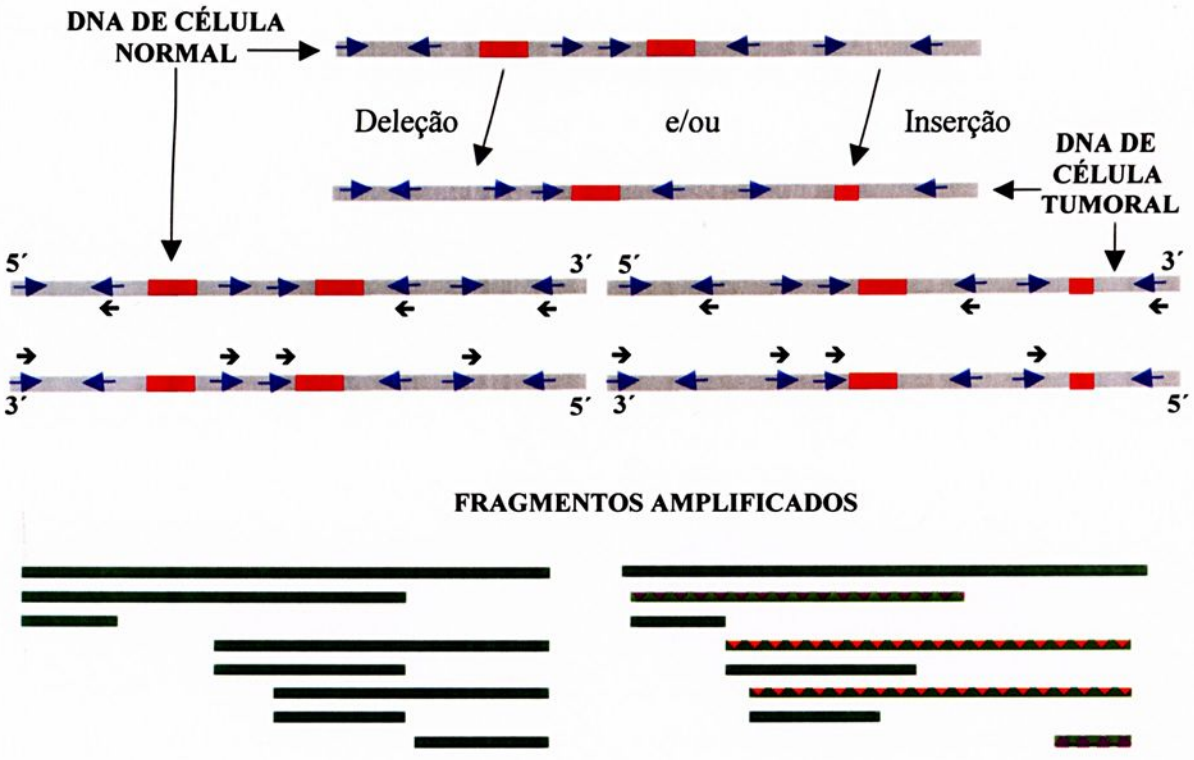


Figura 2. Esquema ilustrativo do método *Alu*-PCR. O DNA genômico é representado por uma linha sólida cinza com sete inserções *Alu* (setas azuis) e dois genes (retângulos vermelhos). O DNA de célula tumoral sofre duas alterações genéticas: deleção de um gene e inserção de uma seqüência gênica. O *primer* único (setas pretas), anela em todas as repetições terminais, amplificando as seqüências entre dois *Alus*. Fragmentos de mesmo tamanho (em verde) representam seqüências correspondentes em tecido normal e tumoral, amplificações extras no tumor representam amplificações com seqüências modificadas por inserções (pontilhado em vermelho) e/ou deleções das seqüências intermediárias (pontilhado em lilás).

IV. Resultados

A. Método de AIMS

Foram estudadas seis amostras de tumores de mama com seus respectivos tecidos adjacentes normais obtidos de blocos de parafina. No grupo controle, três amostras de tecido de mama normal fresco foram obtidas por meio de cirurgia plástica estética.

O DNA das amostras de pacientes normais foi extraído com sucesso, embora a concentração tenha variado bastante. O DNA de tecidos emblocados, também, foi extraído com sucesso, porém foram obtidas concentrações muito baixas; além de o DNA ser razoavelmente degradado. Todas as amostras de DNA transformadas pela técnica de AIMS foram amplificadas, pela Reação em Cadeia da Polimerase, com o conjunto de *primers* Blue 1 e Blue 2.

Com a amplificação dos fragmentos foi possível testar a reprodutibilidade do método AIMS, além de comprovar se a quantidade e a qualidade do DNA utilizado influenciam a reação de amplificação, resultando em variação do número de bandas visualizadas no gel de poliacrilamida e afetando a reprodutibilidade dos resultados.

As reações de PCR foram realizadas em três réplicas a partir da mesma mistura de reação preparada com as amostras de DNA de cada paciente e ao mesmo tempo. As análises de reprodutibilidade, tanto do tecido normal como do tumoral, e as análises para a verificação de presença (hipermetilação) ou ausência (hipometilação) de bandas, no tecido tumoral em relação ao seu tecido adjacente, foram feitas visualmente com o auxílio de um negatoscópio para a contagem das bandas.

Nas quatro figuras que serão apresentadas a seguir são destacados os produtos de amplificação de seqüências supostamente hipermetiladas, ou seja, bandas que estão presentes nas três réplicas de tecido tumoral, mas não nas três réplicas do tecido adjacente ao tumor; como também, os amplificados de seqüências hipometiladas, isto é, bandas ausentes nas três réplicas de tecido tumoral e presentes nas réplicas do tecido adjacente. Nas imagens dos géis é possível visualizar a maioria dessas bandas, indicadas por setas verdes quando

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

hipermetiladas e por setas azuis quando hipometiladas. Algumas bandas não são visíveis nas imagens obtidas por meio de *scanner*, mas puderam ser identificadas por meio do negatoscópio e, portanto, foram incluídas na contagem total.

A Figura 3 mostra os produtos de amplificação das três réplicas de tecidos de mama normais de três pacientes. A análise do gel mostrou que a reprodutibilidade entre as três réplicas foi praticamente total, com exceção de uma banda, de aproximadamente 350 pb, que estava mais intensa na segunda réplica da primeira paciente e duas outras, de aproximadamente 340 pb e 110 pb, que estavam menos intensas na segunda réplica da segunda paciente.

O gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrado na Figura 4, mostrou a reprodutibilidade parcial da técnica de AIMS quando foram utilizados tecidos tumorais e os tecidos adjacentes ao tumor, normais, extraídos de blocos de parafina. As réplicas de tecido tumoral da paciente 1 apresentam, ao todo, 74 bandas e destas 72 (97,3%) foram amplificadas nas três réplicas. A amostra de tecido adjacente apresenta 56 bandas e 42 (75%) se repetem nas três réplicas. A amostra de tecido tumoral da paciente 2 apresenta 49 bandas e, destas, 39 (79,59%) estão presentes nas três réplicas. Na amostra de tecido adjacente foram amplificadas 76 bandas e, destas, 72 (94,73%) ocorrem nas três réplicas.

As Figuras 5 e 6 também mostram a reprodutibilidade parcial da técnica de AIMS para tecidos tumorais e tecidos adjacentes ao tumor extraídos de blocos de parafina. A Figura 5 mostra que as réplicas de tumor da paciente 3 apresentam 48 bandas no total, sendo que 30 (62,5%) foram amplificadas nas três reações de PCR. Na amostra de tecido adjacente normal, 27 (50,9%) das 53 bandas estão presentes nas três réplicas. As amostras da paciente 4 apresentam 59 bandas nas três réplicas de tumor, sendo que 45 (76,27%) foram amplificadas nas três réplicas. Já, no tecido adjacente normal foram amplificadas 40 bandas e, destas, 30 (75%) estão presentes nas três réplicas do DNA.

Na Figura 6 observa-se que a amostra de tecido tumoral da paciente 5 apresenta um total de 60 bandas e 51 (85%) ocorrem nas três réplicas. Na amostra de tecido adjacente normal foram amplificadas 73 bandas e 36 (49,31%) destas estão presentes nas três réplicas. Na amostra do tumor da paciente 6 foram



amplificadas 56 bandas e 39 (69,64%) destas bandas ocorrem nas três réplicas. No tecido adjacente ao tumor foram amplificadas 60 bandas e 39 (65%) destas mostram reprodutibilidade dos resultados.

A Tabela 1 mostra a porcentagem das bandas que se repetem no conjunto de todas as reações de PCR realizadas com as amostras de tumor e de tecidos adjacentes normais. A reprodutibilidade média foi 71,78 %, sendo um pouco maior para os tumores (75,24 %) que para os tecidos adjacentes normais (68,49 %).

Na Tabela 2 são apresentados o número, as médias e os desvios-padrões de bandas hipermetiladas e hipometiladas nos tecidos de tumor e tecidos adjacentes normais de cada paciente, assim como o número de bandas presentes em ambos tecidos. A paciente 1 apresentou oito bandas hipermetiladas (presentes no tecido tumoral, indicadas com setas verdes), uma não observada sem negatoscópio, e três hipometiladas (ausentes no tecido tumoral, indicadas com setas azuis no tecido adjacente normal). Não foram detectadas bandas hipermetiladas na amostra do tecido neoplásico da paciente 2, mas 11 bandas hipometiladas puderam ser visualizadas; nove dessas bandas são indicadas por setas azuis (Figura 4). Na amostra da paciente 3 foram observadas quatro bandas hipermetiladas e apenas uma banda hipometilada. A paciente 4 apresentou quatro bandas hipermetiladas e três hipometiladas (Figura 5). Na paciente 5 puderam ser detectadas 11 bandas hipermetiladas e cinco hipometiladas e na paciente 6 foram observadas quatro bandas hipermetiladas e duas hipometiladas (Figura 6).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

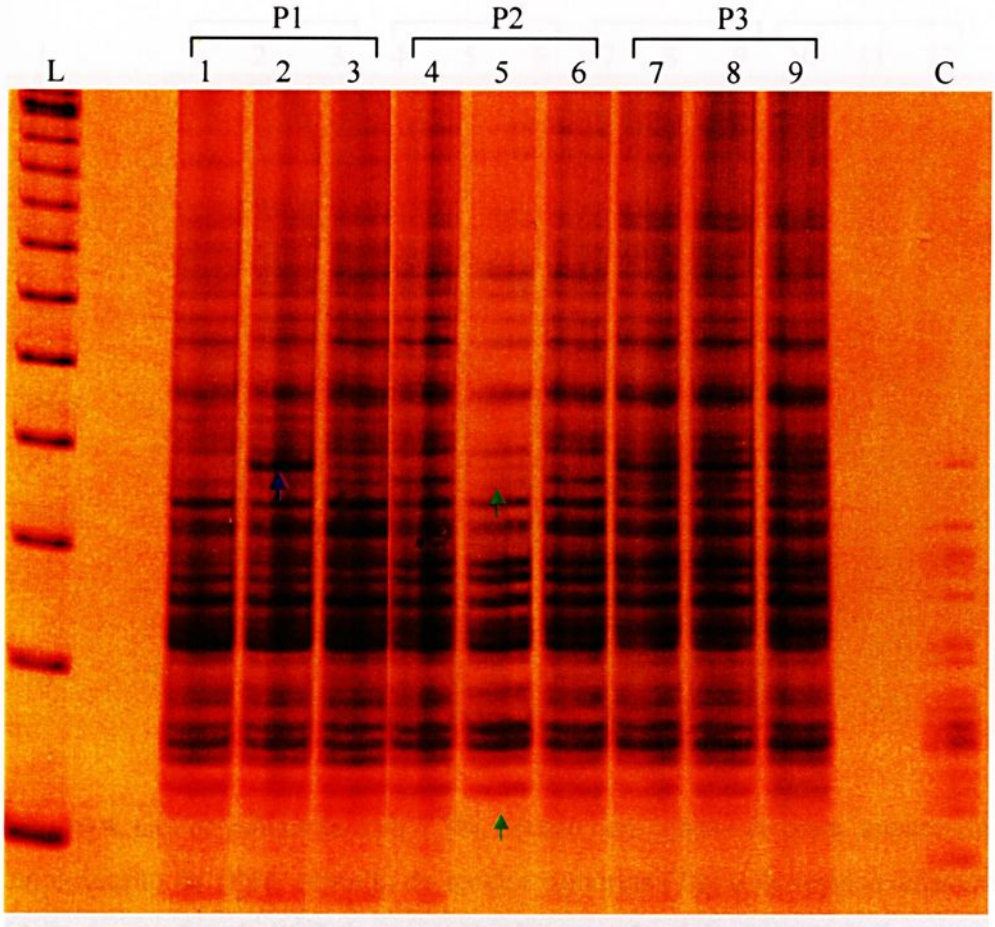


Figura 3. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando produtos de amplificação de DNA extraído de mamas normais. As reações de PCR foram realizadas em três réplicas, a partir da mesma mistura de reação (linhas 1 a 3: paciente 1; 4 a 6: paciente 2; 7 a 9: paciente 3; L: marcador de peso molecular de 100 pb; C: controle branco). A reprodutibilidade foi praticamente total, ocorrendo apenas três disparidades. A seta azul mostra uma banda mais forte em uma das três replicas da paciente 1 e a seta verde mostra duas banda mais fracas na paciente 2.

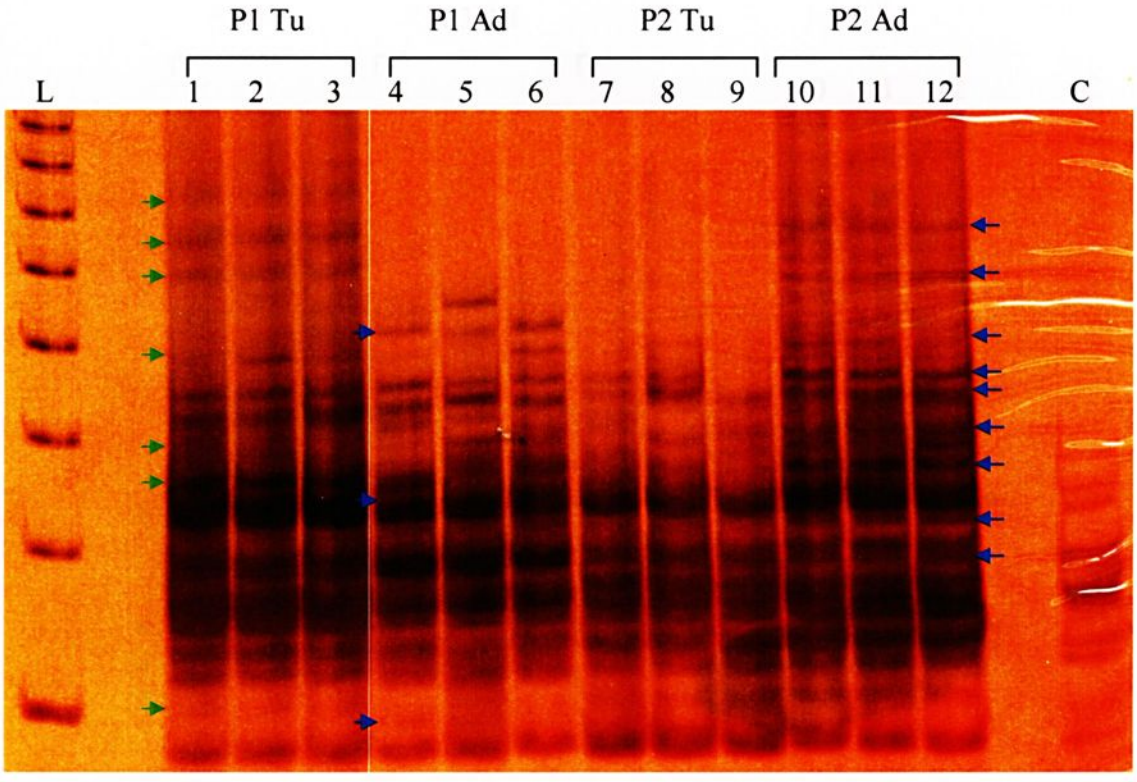


Figura 4. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando produtos de amplificação de DNA extraído de tecidos tumorais (Tu) e de tecidos adjacentes ao tumor (Ad). As reações de PCR foram realizadas em três réplicas a partir da mesma mistura de reação preparada com as amostras de DNA do tumor (Tu) e do tecido adjacente ao tumor (Ad) de duas (P1; P2) pacientes (linhas 1 a 3 e 7 a 9: tecido tumoral; linhas 4 a 6 e 10 a 12: tecido adjacente; L: marcador de peso molecular de 100 pb; C: controle). Bandas consistentemente presentes (hipermetilação) ou ausentes (hipometilação) nas três réplicas do tumor são indicadas por setas verdes e azuis, respectivamente.

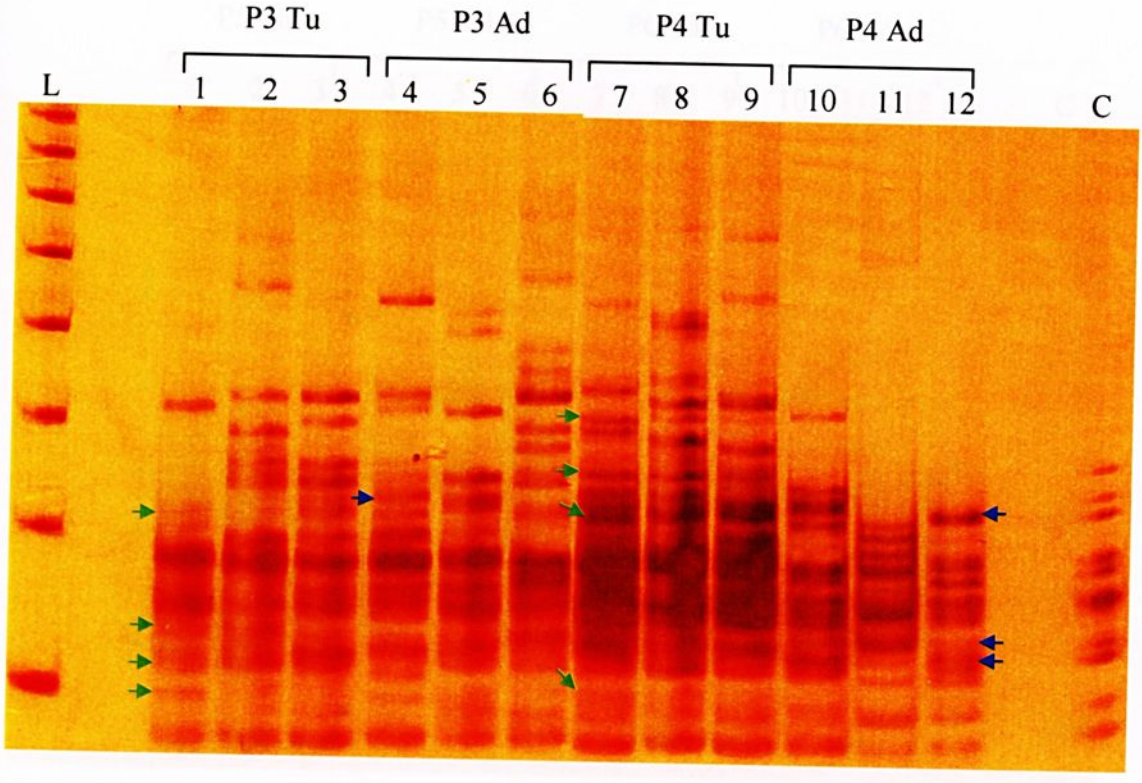


Figura 5. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando produtos de amplificação de DNA extraído de tecidos tumorais (Tu) e de tecidos adjacentes ao tumor (Ad). As reações de PCR foram realizadas em três réplicas a partir da mesma mistura de reação preparada com as amostras de DNA do tumor (Tu) e do tecido adjacente ao tumor (Ad) de duas (P3; P4) pacientes (linhas 1 a 3 e 7 a 9: tecido tumoral; linhas 4 a 6 e 10 a 12: tecido adjacente; L: marcador de peso molecular de 100 pb; C: controle). Bandas consistentemente presentes (hipermetilação) ou ausentes (hipometilação) nas três réplicas do tumor são indicadas por setas verdes e azuis, respectivamente.

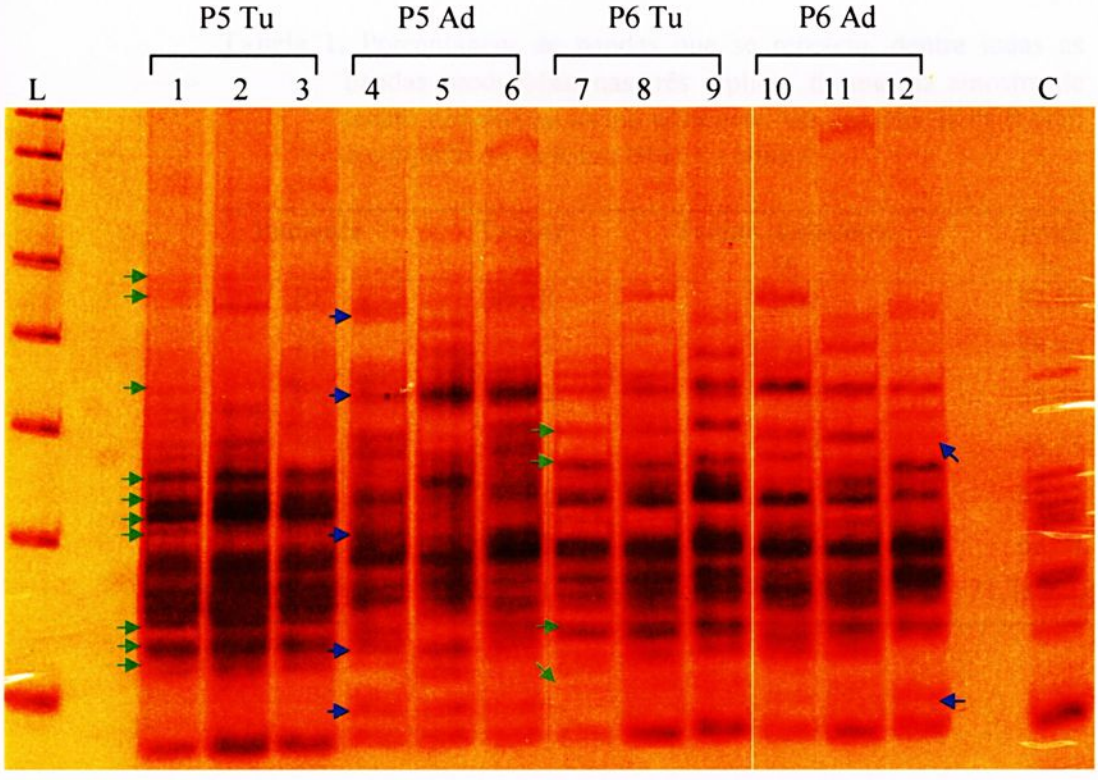


Figura 6. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando produtos de amplificação de DNA extraído de tecidos tumorais (Tu) e de tecidos adjacentes ao tumor (Ad). As reações de PCR foram realizadas em três réplicas a partir da mesma mistura de reação preparada com as amostras de DNA do tumor (Tu) e do tecido adjacente ao tumor (Ad) de duas (P5; P6) pacientes (linhas 1 a 3 e 7 a 9: tecido tumoral; linhas 4 a 6 e 10 a 12: tecido adjacente; L: marcador de peso molecular de 100 pb; C: controle). Bandas consistentemente presentes (hipermetilação) ou ausentes (hipometilação) nas três réplicas do tumor são indicadas por setas verdes e azuis, respectivamente.

Tabela 1. Porcentagem de bandas que se repetem, dentre todas as bandas produzidas, nas três réplicas da mesma amostra de tecido tumoral ou tecido adjacente, nas reações de PCR com o conjunto de *primers* Blue 1 e Blue 2.

Paciente	Tumor %	Tecido Adjacente %	Total %
P1	89,18	75,00	82,30
P2	77,55	93,42	88,00
P3	62,50	49,05	55,44
P4	71,18	82,50	75,75
P5	85,00	49,31	65,41
P6	66,07	61,66	63,79
$\bar{X} \pm S$	75,25 ± 10,56	68,49 ± 18,18	71,78 ± 12,34

Unesp - Biociências, Letras e Ciências Exatas
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

Tabela 2. Número de bandas hipermetiladas (presentes apenas no tumor) e de bandas hipometiladas (ausentes do tumor) no tumor, e das bandas que não apresentaram mudanças e estavam presentes em ambos tecidos, em relação ao tecido adjacente, nas reações de PCR com o conjunto de *primers* Blue 1 e Blue 2. Somente as bandas que apareceram nas três réplicas do mesmo tecido foram consideradas.

Paciente	Bandas Hipermetiladas	Bandas Hipometiladas	Bandas presentes em ambos tecidos
P1	8	3	10
P2	0	11	12
P3	4	1	6
P4	4	3	7
P5	11	5	6
P6	4	2	8
$\bar{X} \pm S$	5,17 ± 3,82	4,17 ± 3,60	8,17 ± 2,40

unesp

B. Método *Alu*-PCR

O perfil de amplificação das seqüências inseridas entre os elementos *Alu* mostrou fragmentos que variaram de 100 pb a 1,4 kb em tamanho; mas, as variações foram mais freqüentes em duas regiões dos géis; uma delas, em que os tamanhos dos fragmentos amplificados variaram de 180 a 400 pb e, outra, em que os tamanhos variaram de 500 entre 1.000 pb. As análises para a verificação do ganho ou perda de bandas entre tecido tumoral, tecido normal adjacente e sangue periférico, foram feitas visualmente, com o auxílio de um negatoscópio. Bandas com intensidade fraca no gel não são visíveis nas imagens obtidas por meio de *scanner*.

A *Alu*-PCR foi realizada com amostras de 14 pacientes e 13 (92,8%) apresentaram ganho ou perda de bandas no tecido tumoral, quando comparado ao tecido adjacente normal e sangue periférico. Foi possível notar que algumas mudanças já ocorreram no tecido adjacente ao tumor de mama quando comparado ao sangue periférico, as quais podem estar associadas à instabilidade genética e à progressão do tumor. Foram consideradas como mudanças, diferenças nos padrões das bandas, assim como a intensidade das bandas dentro de um dado padrão.

Com as amostras de DNA extraído das pacientes 1, 2 e 3 foram realizadas duas reações de PCR a partir da mesma mistura de reação, ao mesmo tempo, para testar a reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo método *Alu*-PCR (Figuras 7 e 8). A ocorrência das mesmas bandas nas três réplicas de cada amostra indica a reprodutibilidade da amplificação. Na Figura 7 são apresentados os resultados da amplificação das amostras de duas pacientes, na quais são destacadas as alterações de amplificação entre os três tipos de tecidos estudados: as amostras da paciente 1 apresentam seis alterações, cinco bandas (cerca de 490, 480, 420, 320 e 250 pb: setas verdes) ocorrem no tecido tumoral e tecido adjacente ao tumor, mas não no sangue periférico. Uma banda, de aproximadamente 280 pb (seta preta), pode ser observada somente no sangue periférico (Figura 7 A). As amostras da paciente 2 apresentam duas bandas, de aproximadamente 500 pb e 450 pb (indicadas por setas verdes), amplificadas em tecido tumoral e tecido adjacente, mas não em

sangue periférico e três bandas, de aproximadamente 320 pb, 280 pb e 200 pb (setas azuis), presentes somente em tecido adjacente (Figura 7 B). Na Figura 8 podem ser observadas três alterações nas amostras de DNA da paciente 3: três bandas, de aproximadamente 900 pb, 850 pb e 800 pb (indicadas por setas lilases), são observadas no tecido adjacente ao tumor e sangue periférico, uma banda de 210 pb (seta vermelha) é observada apenas no tecido tumoral e outra de aproximadamente 610 pb (seta verde) ocorre tanto no tecido tumoral como no tecido adjacente.

A Figura 9 mostra os resultados do estudo de quatro pacientes. Os amplificados das amostras da paciente 4 apresentam 8 modificações: três bandas, de aproximadamente 240, 250 e a outra de 950 pb, estão presentes apenas no sangue periférico e são indicadas por setas pretas; uma banda, de cerca de 320 pb está presente nos três tecidos, mas bem mais intensa em sangue (indicada por uma seta preta) e quatro bandas, de aproximadamente 600 pb, 650 pb, 850 pb e 900 pb, são observadas no tecido tumoral e tecido adjacente, mas não no sangue periférico e estão indicadas com setas verdes (Figura 9 A).

Nas amostras da paciente 5 são observadas apenas duas bandas de aproximadamente 290 pb e 320 pb, presentes em todos os tecidos, porém mais intensas no tecido adjacente ao tumor e estão indicadas com setas azuis (Figura 9 B). Já, nas da paciente 6 podem ser observadas quatro mudanças: uma banda, de cerca de 390 pb, está presente no tecido adjacente e no sangue e não no tumor e está indicada por uma seta lilás; duas (de aproximadamente 340 pb e 270 pb) ocorrem apenas no sangue (indicadas por setas pretas). Uma quarta banda, de cerca de 550 pb (indicada por uma seta preta), foi amplificada nos três tecidos, porém com menor intensidade nas amostras do tumor e do tecido adjacente (Figura 9 C).

Da paciente 7, foram analisadas apenas amostras de tecido tumoral e tecido adjacente. Podem ser notadas três alterações, uma delas é representada por uma banda de aproximadamente 270 pb, mais intensa no tumor do que em sua borda adjacente e duas bandas, com cerca de 390 pb e 610 pb, presentes apenas no tumor. Todas as bandas são indicadas com setas vermelhas (Figura 9 D).



Três bandas, de aproximadamente 780 pb, 720 pb e 260 pb, ocorrem apenas no sangue da paciente 8 e são indicadas por setas pretas (Figura 10 A). Os amplificados da paciente 9 mostram três alterações: uma banda de aproximadamente 370 pb e outra de 680 pb estão presentes no tumor e no tecido adjacente, mas não na amostra de sangue (indicadas por setas verdes) e, uma terceira banda, de cerca de 500 pb, foi amplificada somente no tecido adjacente ao tumor e está indicada por uma seta azul (Figura 10 B).

A paciente 10 apresentou três alterações: uma banda de cerca de 480 pb, que ocorre apenas no tecido adjacente ao tumor (indicada por seta de cor azul) e duas bandas, de aproximadamente 640 e 360 pb, que não ocorre no tecido tumoral e são indicadas por setas lilases (Figura 10 C).

Nas amostras de DNA da paciente 11 uma banda, de aproximadamente 510 pb, está presente apenas nos tecido tumoral e adjacente, e três bandas, de aproximadamente 410 pb, 390 pb e 350 pb, presentes no tecido adjacente ao tumor e no sangue periférico, indicadas por setas lilases (Figura 11 A). Não são detectadas alterações nos amplificados das amostras de DNA da paciente 12 (Figura 11 B). Por outro lado, a paciente 13 apresenta quatro bandas somente em sangue periférico, de aproximadamente 580 pb, 350 pb, 340 pb e 290 pb que são indicadas por setas pretas (Figura 11 C). Também nas amostras da paciente 14 são observadas seis bandas. Na amostra de sangue são observadas três bandas (de aproximadamente 530, 200 e 180 pb), indicadas por setas pretas, e na amostra de sangue e do tecido adjacente ao tumor é observada uma banda de 460 pb que está indicada por uma seta lilás. Duas bandas (cerca de 290 e 250 pb) aparecem tanto no tumor como no sangue periférico, mas não em tecido adjacente e são indicadas com setas cinza (Figura 11 D).

A Tabela 3 mostra todas as alterações que ocorreram nas amostras de DNA de cada paciente. Em média, foram observadas 4,00 ± 1,96 alterações de amplificação de bandas, sendo que 1,35 ± 1,60 em média dessas estavam presentes apenas na amostra do tecido neoplásico (amplificações, duplicações gênicas) e 2,64 ± 1,64 estavam ausentes deste tecido (deleções de seqüências gênicas).

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

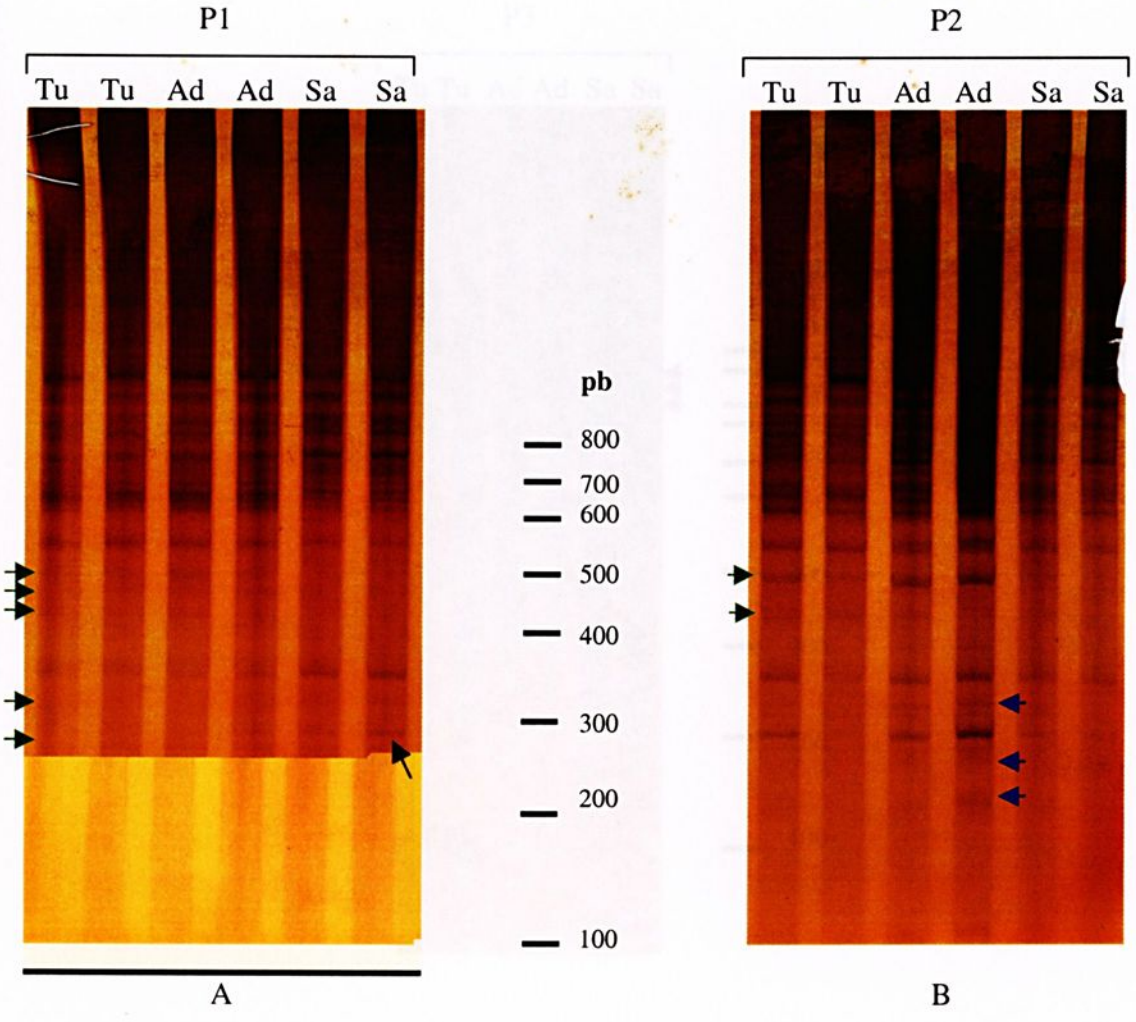


Figura 7. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando reprodutibilidade do resultado de amplificação da *Alu*-PCR. As reações de PCR foram realizadas com DNA extraído de tecidos tumorais (Tu), de tecidos adjacentes ao tumor (Ad) e sangue (Sa). Os amplificados de duas réplicas preparadas com a mesma mistura de reação das amostras de duas pacientes (P1; P2) são apresentadas em A e B, respectivamente. As linhas 1, 2, 7 e 8 representam tecido tumoral (Tu); as linhas 3, 4, 9 e 10, tecido adjacente ao tumor (Ad) e as linhas 5, 6, 11 e 12 sangue periférico (Sa). Bandas presentes no tumor e tecido adjacente (ganho de bandas) são indicadas por setas verdes e bandas presentes apenas em sangue (perda de bandas) são indicadas por setas pretas. As setas azuis indicam bandas presentes somente em tecidos adjacentes normais. Entre as duas figuras encontra-se uma representação esquemática do marcador de peso molecular de 100 pb.

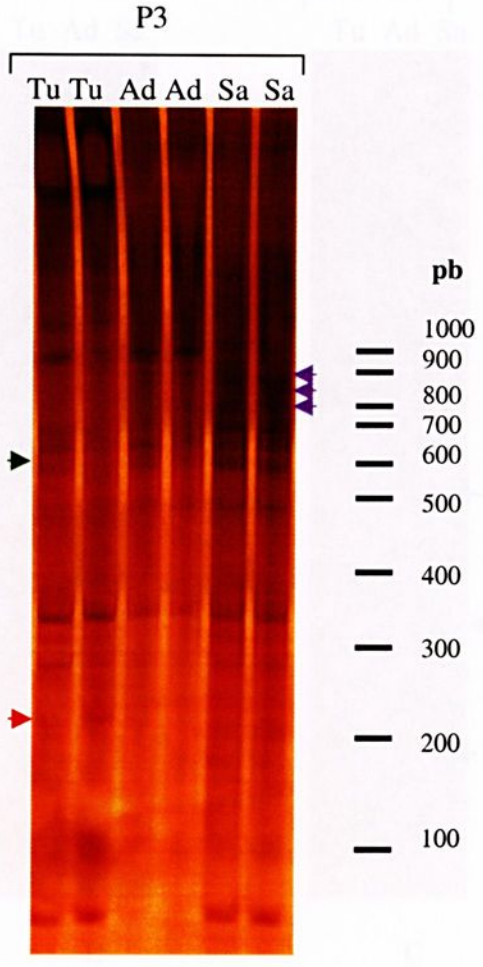


Figura 8. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando reprodutibilidade do resultado de amplificação da *Alu*-PCR. As reações de PCR foram realizadas em duas réplicas, a partir da mesma mistura de reação das amostras de DNA extraído de tecidos tumorais (Tu), de tecidos adjacentes ao tumor (Ad) e sangue (Sa) da paciente 3. As linhas 1 e 2 representam tecido tumoral (Tu); as linhas 3 e 4, tecido adjacente ao tumor (Ad) e as linhas 5 e 6 sangue periférico (Sa). Bandas presentes no tumor e tecido adjacente (ganho de bandas) são indicadas por setas verdes e bandas presentes apenas em tumor são indicadas por setas vermelhas. As setas lilases indicam bandas presentes em tecidos adjacentes normais e no sangue periférico. Ao lado direito da figura encontra-se uma representação esquemática do marcador de peso molecular de 100 pb.

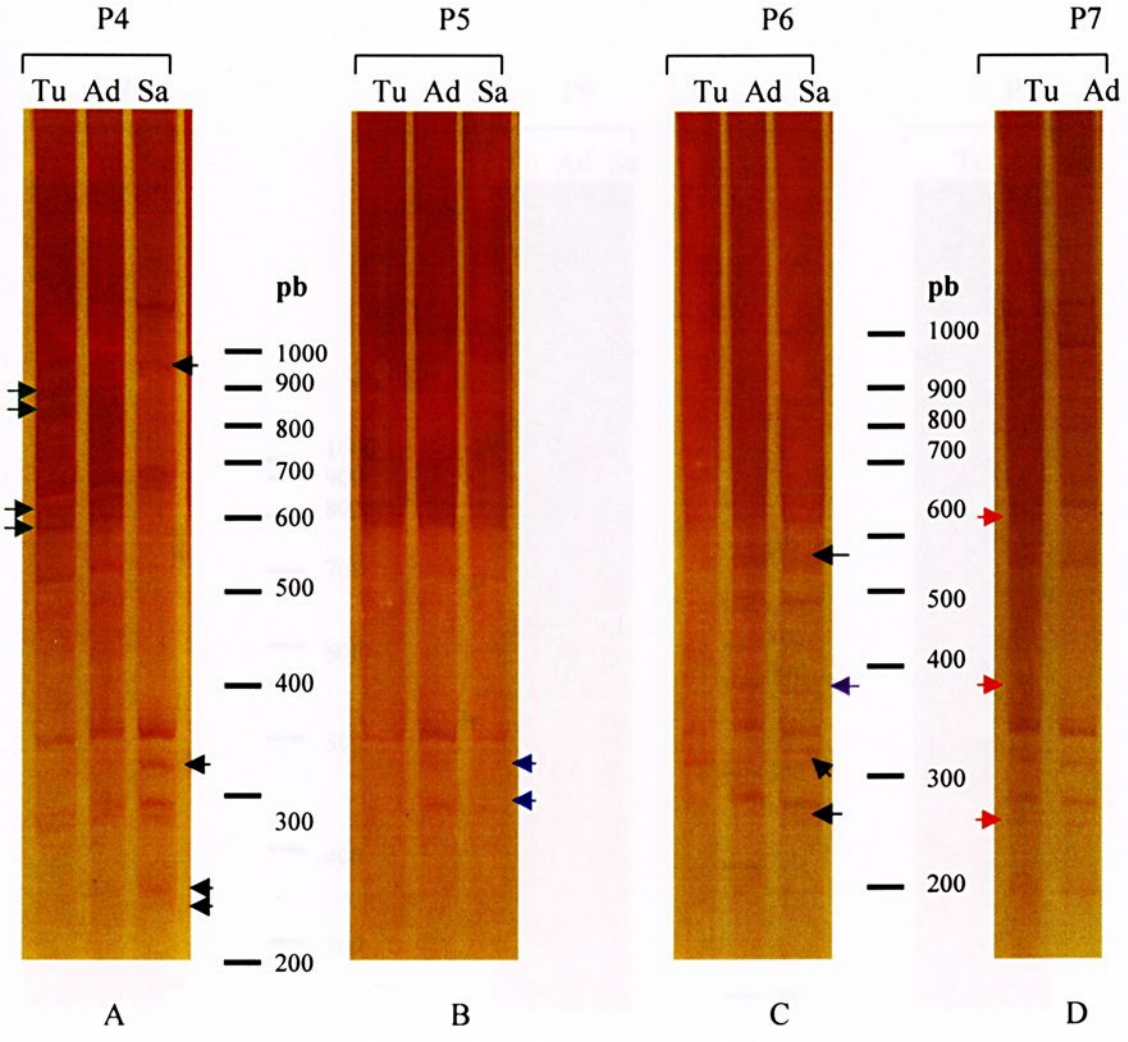


Figura 9. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando os fragmentos gerados pela *Alu*-PCR. As reações de PCR foram realizadas com DNA extraído de tecidos tumorais (Tu), de tecidos adjacentes ao tumor (Ad) e sangue (Sa). Os amplificados das amostras de quatro pacientes (P1; P2; P3 e P4) são apresentados em A, B, C e D, respectivamente. As linhas 1, 4, 7 e 10 representam tecido tumoral (Tu); as linhas 2, 5, 8 e 11, tecido adjacente ao tumor (Ad) e as linhas 3, 6 e 9 sangue periférico (Sa). Bandas presentes no tumor e tecido adjacente (ganho de bandas) são indicadas por setas verdes e bandas presentes apenas em sangue (perda de bandas) são indicadas por setas pretas. As setas azuis indicam bandas presentes somente em tecidos adjacentes normais, as setas vermelhas indicam bandas presentes somente no tumor e as setas lilases indicam bandas presentes no tecido adjacente ao tumor e no sangue periférico. Entre as figuras encontra-se uma representação esquemática do marcador de peso molecular de 100 pb: à esquerda para as figuras A e B e à direita para as figuras C e D.

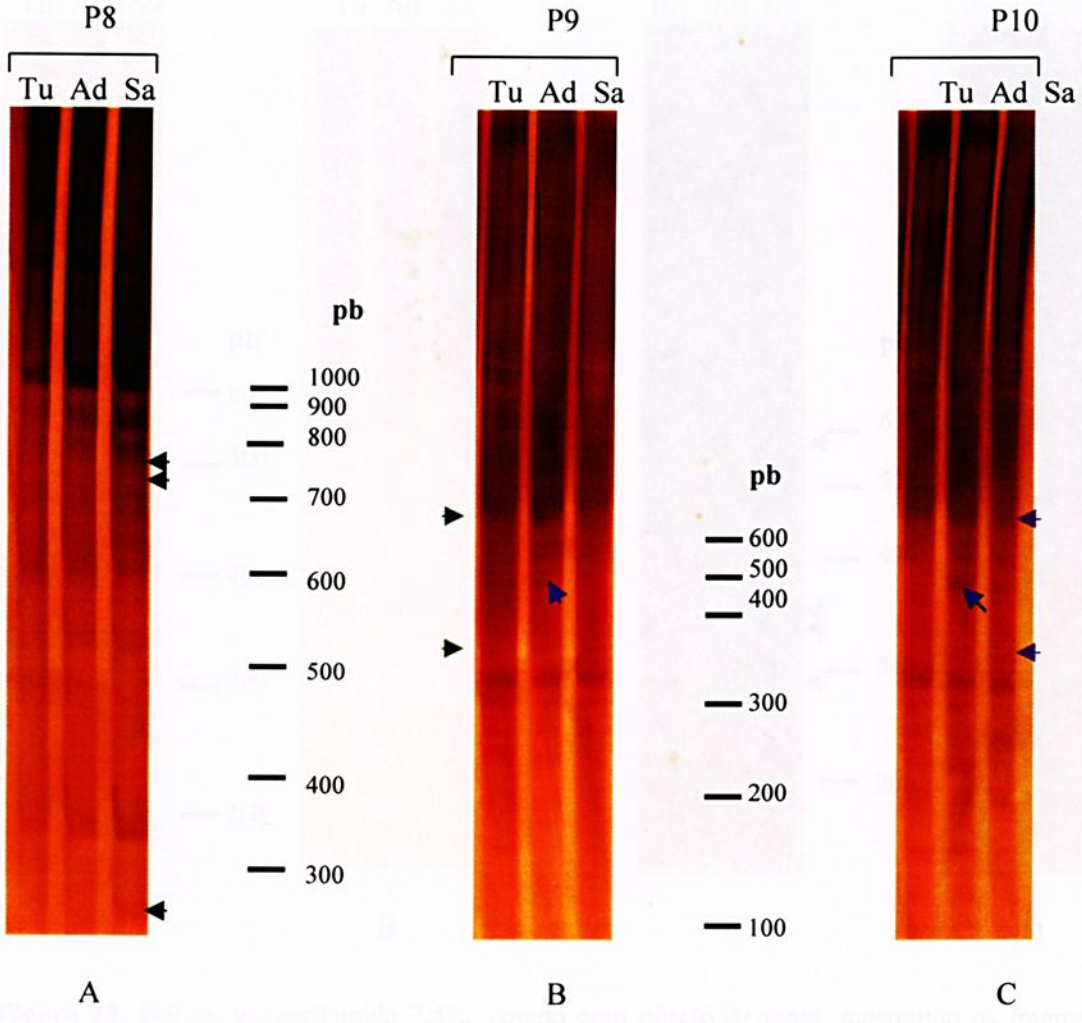


Figura 10. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando os fragmentos gerados pela *Alu*-PCR. As reações de PCR foram realizadas com DNA extraído de tecidos tumorais (Tu), de tecidos adjacentes ao tumor (Ad) e sangue (Sa). Os amplificados das amostras de três pacientes (P8; P9; P10) são apresentados em A, B e C, respectivamente. As linhas 1, 4 e 7 representam tecido tumoral (Tu); as linhas 2, 5 e 8, tecido adjacente ao tumor (Ad) e as linhas 3, 6 e 9 sangue periférico (Sa). Bandas presentes no tumor e tecido adjacente (ganho de bandas) são indicadas por setas verdes e bandas presentes apenas em sangue (perda de bandas) são indicadas por setas pretas. As setas azuis indicam bandas presentes somente em tecidos adjacentes normais e as setas lilases indicam bandas presentes no tecido adjacente ao tumor e no sangue periférico. Entre as figuras encontra-se uma representação esquemática do marcador de peso molecular de 100 pb: à esquerda para a figura A e à direita para as figuras B e C.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

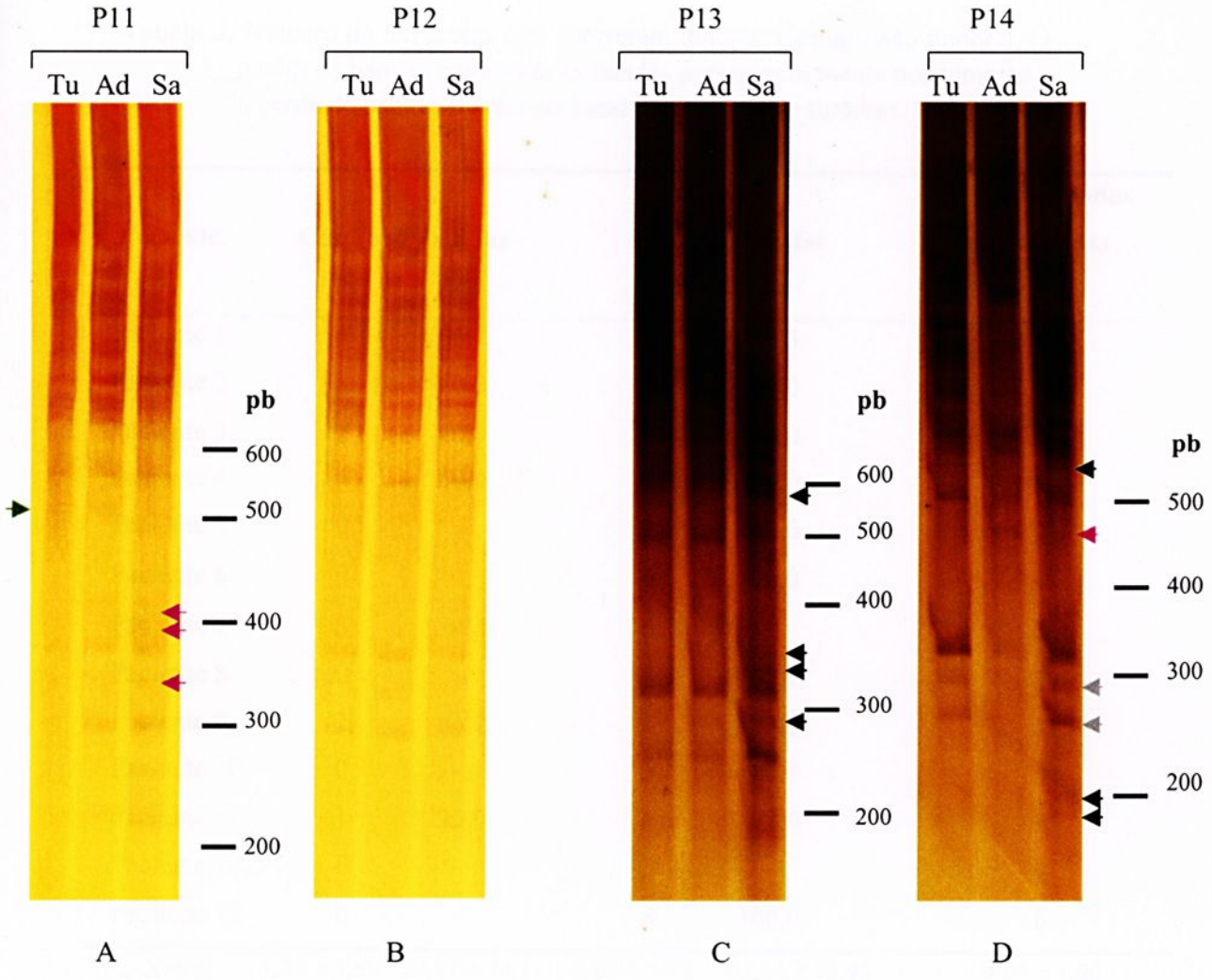


Figura 11. Gel de poliacrilamida 7,5%, corado com nitrato de prata, mostrando os fragmentos gerados pela *Alu*-PCR. As reações de PCR foram realizadas com DNA extraído de tecidos tumorais (Tu), de tecidos adjacentes ao tumor (Ad) e sangue (Sa). Os amplificados das amostras de quatro pacientes (P11; P12; P13 e P14) são apresentados em A, B, C e D, respectivamente. As linhas 1, 4, 7 e 10 representam tecido tumoral (Tu); as linhas 2, 5, 8 e 11, tecido adjacente ao tumor (Ad) e as linhas 3, 6, 9 e 12 sangue periférico (Sa). Bandas presentes no tumor e tecido adjacente (ganho de bandas) são indicadas por setas verdes e bandas presentes apenas em sangue (perda de bandas) são indicadas por setas pretas. As setas cinza indicam bandas presentes em tecidos tumorais e no sangue periférico e setas lilases indicam bandas presentes no tecido adjacente ao tumor e no sangue periférico. Entre as figuras encontra-se uma representação esquemática do marcador de peso molecular de 100 pb: à esquerda para as figuras A e B e à direita, entre duas figuras, para a figuras C e à direita, do lado externo da figura, para a figura D.

Tabela 3. Número de mudanças que ocorreram durante a progressão tumoral. O ganho de bandas representa as bandas presentes somente nos tumores e a perda de bandas representa bandas ausentes nos tumores.

Paciente	Ganho de bandas		Perda de bandas		Total de bandas modificadas
	N	%	N	%	N
Paciente 1	4	66,7	2	33,3	6
Paciente 2	3	60,0	2	40,0	5
Paciente 3	2	40,0	3	60,0	5
Paciente 4	4	50,0	4	50,0	8
Paciente 5	0	-	2	100,0	2
Paciente 6	0	-	4	100,0	4
Paciente 7	3	100,0	0	-	3
Paciente 8	0	-	3	100,0	3
Paciente 9	2	66,7	1	33,3	3
Paciente 10	0	-	3	100,0	3
Paciente 11	1	25,0	3	75,0	4
Paciente 12	0	-	0	-	0
Paciente 13	0	-	6	100,0	6
$\bar{X} \pm S$	1,35 ± 1,60	29,17 ± 34,31	2,64 ± 1,64	63,68 ± 37,98	4,00 ± 1,96

V. Discussão

A. Método de AIMS

Células de câncer mostram padrões de metilação aberrante do DNA incluindo hipermetilação de ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras dos genes. Vários estudos têm mostrado a ocorrência de metilação aberrante de regiões promotoras de genes reguladores de crescimento, como *p16, RASSF1A, cyclinD2 e 14-3-3σ* (Lehmann *et al.*, 2002), durante a progressão do câncer de mama. Um estudo amplo demonstrou a metilação do gene BRCA1 em cânceres de mama e ovário (Catteau *et al.*, 1999). Metilação aberrante do gene GSTπ (Esteller *et al.*, 1998) também foi encontrada em câncer de mama, como também do gene receptor de estrógeno (Ottaviano *et al.*, 1994; Lapidus *et al.*, 1998), do gene da E-cadherin (Graff *et al.*, 1995; Hiraguri *et al.*, 1998), do CDH1, do RARβ2 e, em menor freqüência, do gene GSTP1 (Esteller *et al.*, 2001).

Bernardino *et al.* (1997) avaliou o estado global de metilação em câncer de mama e, quando comparados aos tecidos normais os tecidos tumorais apareceram, na grande maioria, fortemente hipometilados. Assim, a hipometilação do DNA é uma característica coerente de câncer de mama, mas esta variação pode não ter correlação com a progressão do tumor de muitos cânceres de mama. As células tumorais também apresentam uma desmetilação global do genoma tanto em casos esporádicos como em casos hereditários (Esteller *et al.*, 2001).

A investigação de seqüências diferencialmente metiladas no tumor aparece como uma ferramenta chave para o entendimento dos mecanismos moleculares que ocorrem durante a transformação maligna das células. O método de AIMS, proposto por Frigola *et al.* (2002) é capaz de produzir *fingerprints* representativos da metilação de todo DNA e permite a identificação de seqüências hipo e hipermetiladas.

Frigola *et al.* (2002) investigaram o estado de metilação em 20 amostras de carcinoma colorretal pareado com tecido normal não-adjacente das mesmas pacientes, todos espécimes frescos, utilizando quatro conjuntos de *primers*. O primeiro conjunto continha três nucleotídeos arbitrários (Blue-CCGGG-CTA e Blue-CCGGG-TGG) na extremidade 3'. O segundo conjunto de *primers*, também



possuía outros três nucleotídeos arbitrários na extremidade 3´ (Blue-CCGGG-CTG e Blue-CCGGG-TGG). Este conjunto de *primers* foi utilizado para a realização deste trabalho com câncer de mama. O terceiro conjunto de *primers* continha quatro nucleotídeos na extremidade 3'(Blue-CCGGG-CGCG e Blue-CCGGG-CAAC) e o quarto conjunto continha apenas um *primer* com dois nucleotídeos arbitrários na extremidade 3' (Blue-CCGGG-TG). Dezenove dos vinte pares de tecido tumoral e tecido normal produziram *fingerprints* legíveis para todos os conjuntos de *primers*. A razão da produção de um *fingerprint* pouco legível, por um único par, foi, segundo os autores, a má qualidade do DNA.

Diferenças na intensidade das bandas entre amostras de tumores e seus tecidos adjacentes normais foram averiguadas por aqueles autores por inspeção visual direta. Bandas que aparecem no tumor, mas não no tecido normal adjacente ao tumor foram interpretadas como hipermetiladas. Um relativo decréscimo na intensidade de uma banda no tumor em relação ao tecido normal foi considerado um sintoma de hipometilação. Perda em homozigose e amplificação gênica, também, podem produzir mudanças dramáticas na manifestação de uma banda. Portanto, de acordo com os autores acima citados esta possibilidade, embora incomum, deveria também ser considerada na interpretação da representação diferencial.

No estudo com carcinoma colorretal, o método de AIMS produziu um alto padrão de bandas. Foram amplificadas bandas de aproximadamente 200 a 2000 pb, embora o tipo de gel de eletroforese utilizado pelos pesquisadores excluísse a resolução de fragmentos com mais de 1200 pb. Em nosso estudo, utilizamos amostras de tecido de tumores de mama e tecido normal adjacente ao tumor, de seis pacientes, obtidos de emblocados de parafina. A dissecação destes tecidos emblocados, separando regiões que continham apenas tecido tumoral ou apenas tecido normal adjacente ao tumor das regiões contendo ambos os tipos de tecido foi realizada, pela médica patologista, do Hospital de Base de São José do Rio Preto, Drª Patrícia Maluf Cury. Um dos objetivos deste trabalho foi testar a aplicação do método de AIMS para amostras de DNA obtidas de tecidos conservados em blocos de parafina, pela vantagem que apresentam de se obter

células neoplásicas não contaminadas com células normais e vice-versa. Todas as pacientes realizaram a biópsia no ano de 2001 e a maioria apresentava carcinoma ductal invasivo com grau III. A idade das pacientes variou de 50 a 69 anos (59,83 ± 7,41).

Três diferentes experimentos, realizados por Frigola *et al.* (2002), com os três primeiros conjuntos de *primers* produziram 168 bandas. O segundo conjunto de *primers* produziu 52 bandas que foram avaliados para a representação diferencial entre tumor e tecido normal. Quando os dados foram observados por casos, tanto perdas como ganhos de bandas foram observados na maioria dos tumores (em 17 de 19 pacientes) e estas pareciam estar distribuídas independentemente. Em média, 1,35 ± 1,33 das bandas informativas estavam ausentes no tumor; em contraste, 1,03 ± 095 estavam presentes.

Em nosso estudo foi possível amplificar bandas de aproximadamente 50 a 2400 pb. Todas as pacientes, com câncer de mama, apresentaram perdas, ganhos ou ambos os tipos de bandas, caracterizando a ocorrência de hipermetilação ou hipometilação diferencial nas amostra de tecido neoplásico. Em média, 5,17 ± 3,82 bandas informativas estavam presentes no tumor, mas não no tecido normal e 4,17 ± 3,60 estavam ausentes quando se utilizou o segundo conjunto de *primers* utilizado em câncer colorretal. O maior número de bandas informativas obtidas neste trabalho pode ser devido à natureza do tumor estudado.

Algumas mudanças foram feitas no procedimento desta técnica. Frigola *et al.* (2002) utilizaram a enzima de restrição *Psp* AI por 6 horas a 37 °C, como o isoquizômero da *Sma*I, e na realização da PCR foram usados aproximadamente 6 ng de DNA em uma reação final de 25 µl, além da utilização de 1 µCi [α- ^{33}P] dATP. No presente estudo foi utilizada a enzima *Xma*I, que reconhece e digere o mesmo sítio de restrição da *Psp*AI, por 10 horas a 37 °C, pois esta última enzima não é mais comercializada. Foi necessário aumentar a quantidade de *template*, 30 ng de DNA obtido de pacientes saudáveis que realizaram cirurgia plástica estética e aproximadamente 45 ng e 60 ng de DNA de tumor e de tecido adjacente normal, pois com menores quantidades de DNA poucas bandas eram produzidas e não houve reprodutibilidade entre as réplicas. Ainda, não foi utilizado dATP marcado

radioativamente, pois nosso objetivo era testar se o método seria aplicável em laboratórios que não possuem autorização para usar isótopos radioativos.

O gel utilizado por Frigola *et al.* (2002) era desnaturante, sendo o DNA amplificado desnaturado por 3 minutos a 95 °C, diluído em ¼ em formamida. A quantidade de amplificado aplicado no gel foi de 3 µl. No presente trabalho foi utilizado gel de poliacrilamida não desnaturante e o DNA amplificado, também, não foi desnaturado, pois o padrão de bandas em gel desnaturante e não-desnaturante foi praticamente o mesmo. Foi aplicado 5 µl de DNA normal e 10 µl de DNA tumoral e de tecido adjacente. Os géis foram corados com nitrato de prata, enquanto no método original o gel era exposto a um filme de raio-x de 3 a 6 dias.

A reprodutibilidade do AIMS foi examinada por Frigola *et al.*(2002) por meio de análises de duas réplicas de pares de DNA normal-tumoral obtidos de pacientes com câncer coloretal. O padrão foi altamente reprodutível, e as principais diferenças entre tumor e tecido adjacente puderam ser detectadas em ambas as réplicas.

A técnica modificada de AIMS, estabelecida neste trabalho, funcionou muito bem para DNA genômico extraído de tecido mamário normal fresco. Com a utilização do DNA genômico de ótima qualidade foi possível conseguir um gel límpido, a partir de uma PCR na qual, apenas, 2 µl de DNA ligado aos adaptadores (cerca de 30 ng) serviu como *template* em uma reação com o volume final de 25 µl. Por isso, a reprodutibilidade do AIMS em condições modificadas foi testada com a utilização de DNA de boa qualidade.

Quando se utilizou DNA extraído de tecido tumoral emblocado com parafina não se conseguiu um padrão de bandas como o de DNA fresco, o que se pode ver é um padrão com menor número de bandas. As PCRs tiveram que ser realizadas com maior quantidade de DNA, 3 µl e 4 µl de DNA de tumor e tecido adjacente (cerca de 45 e 60 ng), respectivamente, ligado aos adaptadores. Também, foi necessário aplicar o dobro da quantidade de amplificado do DNA extraído de tecidos emblocados no gel de poliacrilamida que a quantidade de amplificados de tecidos frescos.



A reprodutibilidade da técnica, quando se utilizou DNA de tecido conservado em bloco de parafina, que geralmente é obtido em pequena quantidade e razoavelmente degradado, não foi tão eficaz quanto quando se utilizou o DNA de boa qualidade. Com esse tipo de DNA, uma média de 75,25% ± 10,56% de todas bandas produzidas se repetiram nas três réplicas dos tecidos tumorais, enquanto que apenas 68,49% ± 18,18% de todas as bandas se repetiram nas réplicas de tecido adjacente ao tumor. Já com DNA extraído de tecidos frescos, praticamente todas as bandas estavam presentes nas três réplicas.

A qualidade e a quantidade recebida de cada amostra, também, influenciou a reprodutibilidade e afetou o padrão de bandas produzido. A maior parte das amostras de tecido tumoral possuia um DNA de melhor qualidade, além de maior quantidade, do que as amostras de tecido normal adjacente.

Somente as bandas que apareceram nas três réplicas de cada tecido, tumoral ou normal, de cada paciente foram consideradas para refletir as alterações de metilação do tumor, descartando, assim, a possibilidade de ser considerada como hipometilada uma seqüência cuja banda estava ausente ou menos intensa pela pouca quantidade de DNA.

Segundo Frigola e co-autores, a hipometilação raramente aparece como a ausência completa de uma banda devido a presença, quase sempre inevitável, de contaminação com células normais nos espécimes de tumor. Esta afirmação foi feita pelo fato dos autores usarem tecidos frescos. Apesar desta limitação, decréscimos de intensidade atribuídos a hipometilação foram detectadas, pelos autores, no DNA de tumor diluído 16 vezes no DNA de tecido normal. Os *fingerprints* analisados mostraram claras mudanças entre tumor e tecido normal e também alguma variação na intensidade entre amostras pareadas. Neste caso, os autores consideraram apenas as variações seguras e, portanto, existe, provavelmente uma sub-estimativa do percentual de metilação aberrante em células de câncer. Algumas bandas exibiram uma manifestação individual específica (apareciam em ambos tecidos de tumor e adjacente de alguns indivíduos, mas não em outros), sugerindo sua natureza polimórfica.



No presente estudo, não foi realizada a comparação de uma determinada banda, entre todos os *fingerprints*, das seis pacientes, devido ao fato de a reprodutibilidade obtida não ser total. E, também, pelo fato de que foram corridos três géis diferentes, onde cada gel representa amostras de apenas duas pacientes, portanto, seria duvidoso afirmar, com certeza, que uma determinada banda de uma paciente seria a mesma em outra.

Esse estudo mostrou que as modificações do método de AIMS não influenciaram a obtenção dos resultados esperados, pois a amplificação ocorreu normalmente e o padrão de bandas ficou bastante visível quando utilizado DNA de tecidos frescos. Mesmo com a produção de *fingerprints* não totalmente legíveis com DNA extraído de blocos de parafina foi possível identificar seqüências diferencialmente metiladas nas amostras de tecidos neoplásicos. Desse modo, como realizado por Frigola *et al.* (2002), ao utilizarmos o método com as modificações propostas nesse trabalho será possível isolar, do gel de poliacrilamida, as bandas diferencialmente metiladas, eluir o DNA e amplificá-lo com os mesmos *primers* e condições usadas no experimento de AIMS. Os produtos de PCR, clonados e seqüenciados, poderão revelar novos genes, alvos de metilação anormal em câncer, críticos ao processo de carcinogênese.

B. *Alu*-PCR

A progressão do tumor de mama pode seguir uma via caracterizada por alterações cariotípicas com rearranjos estruturais e em particular perdas cromossômicas. Essas alterações levam a perdas alélicas que podem desmascarar mutações recessivas de genes supressores de tumor e amplificações envolvendo oncogenes e genes relacionados com fator de crescimento (Dutrillaux, 1995). Como exemplos, podem se citadas as mutações encontradas nos genes VHL e CDKN2A em formas esporádicas de câncer de mama (Herman, 1999), como também nos genes BRCA1 e BRCA2, em alguns cânceres hereditários (Catteau & Morris, 2002). Amplificações de genes, tais como a do gene HER2/neu, também têm sido detectadas em câncer de mama (Pegram *et al.*, 1998).



Os elementos transponíveis *Alu* foram examinados como um marcador de mudanças genéticas associadas com o potencial para metástase de carcimonas de pulmão, através da *Alu*-PCR por Furmaga *et al.* (2003) e para distingüir carcinóides pulmonares "típicos" e carcinóides de intestino "clássicos", histologicamente similares (Furmaga *et al.*, 2004). Este método não examina locos específicos, mas resulta em um perfil de bandas do DNA genômico celular. Os padrões de bandas obtidos podem mostrar diferenças entre tecidos tumorais com diferentes graus de desenvolvimento e, também, entre tecido tumoral e tecido normal, da mesma paciente, que servem como controle. Os trabalhos iniciais sugerem que o método *Alu*-PCR pode oferecer um meio adequado para a identificação de genes responsáveis pela progressão do tumor e metástases. Nelson *et al.* (1991) utilizaram um conjunto de *primers,* ao invés, de um *primer* único para realizar a *Alu*-PCR, sendo que um deles anelava ao elemento transponível e o outro em um seqüência de um YAC (do inglês: *yeast artificial chromosome*). Assim, os autores geraram sondas e vários clones foram identificados em regiões de interesse médico, como locais que ocorreram translocações e deleções involvidas com doenças genéticas.

Furmaga *et al.* (2003) investigaram as alterações genéticas, que ocorrem durante o desenvolvimento de um tumor, através da técnica de *Alu*-PCR, utilizando um único *primer*, em 20 pacientes com câncer de pulmão, todos carcinomas primários obtidos de blocos de parafina. Essas pacientes foram incluídas em dois grupos, no primeiro seis pacientes possuíam metástase intrapulmonar e no segundo 14 pacientes possuíam metástase extrapulmonar. Este último grupo foi dividido em quatro pacientes apresentando apenas metástase extrapulmonar, seis apresentando metástases intra e extrapulmonar e quatro com metástase extrapulmonar localizadas no cérebro.

No presente estudo, o método *Alu*-PCR foi utilizado em amostras de DNA extraído de tecidos frescos de pacientes portadores de câncer de mama, 13 mulheres e um homem. A idade variou de 41 a 68 anos (52 ± 9,56). A maioria das pacientes apresentava carcinoma ductal invasivo de grau II ou III. O único paciente masculino, paciente 13, não apresentou diferenças em relação às



mulheres. Não houve diferenças entre o número total de variações genéticas das pacientes com tumor grau II (3,75 ± 1,70) e grau III (3,57 ± 1,90).

Para a realização do método, Furmaga e colaboradores utilizaram Hot Start taq (Quiagen). Neste trabalho, utilizou-se uma Taq DNA polimerase comum (Invitrogen), como também, o DNA amplificado foi purificado com o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) para melhorar a visualização das bandas no gel.

Como resultado do perfil *Alu*, investigando câncer de pulmão, Furmaga *et al*. (2003) obtiveram fragmentos de amplificados de DNA cujas bandas variavam entre 126 a 460 pb. Quatro das seis pacientes (67%) com metástases intrapulmonares apresentaram variações genéticas no tumor em relação ao tecido normal. As variações mais proeminentes estavam localizadas em duas regiões, uma 126 a 135 pb e a outra 160 a 175 pb. Nove, das catorze pacientes (64%) que apresentaram metástases extrapulmonares, mostraram alterações genéticas. Cinco, de seis pacientes (83%) com metástases intra e extrapulmonares, apresentaram alterações e estas eram mais proeminentes nas mesmas regiões de 126 a 135 e 160 a 175. Três, de quatro pacientes (75%) com metástase no cérebro, apresentaram uma discreta banda de 126 pb no tecido normal, mas não no tumoral. Outras mudanças no padrão de bandas e também na de intensidade das bandas foram encontradas nessas pacientes. Três, de quatro (75%) pacientes que apresentaram apenas metástase extrapulmonar, exibiram variações em duas regiões diferentes, uma de 126 – 135 pb e outra de 179 – 250 pb. Com isso, os autores concluíram que pacientes com metástases intrapulmonares apresentaram maior freqüência de mudanças genéticas do que as pacientes com metástases extrapulmonares. Dentre este último grupo, uma porcentagem maior de pacientes com metástases intra e extrapulmonares apresentaram mudanças genéticas, enquanto que a mesma porcentagem de pacientes com metástases extrapulmonares e metástases no cérebro apresentaram variações genéticas.

No presente trabalho foram amplificados fragmentos de 100 a mais de 1000 pb e 92,8% das amostras (13 de 14 pacientes) apresentaram alterações genéticas. Também, puderam ser caracterizadas duas regiões em que as alterações



foram mais freqüentes, que variaram de 150 – 380 e 500 – 1000 pb. Perdas de fragmentos sugerem a ocorrência de deleções no DNA das células neoplásicas. Também, podem ocorrer duplicações, como resultado de recombinação desigual entre os elementos transponíveis *Alu*, ou amplificações gênicas ocasionando o aparecimento de uma banda extra nas amostras de tumor. Bandas extras podem também resultar da movimentação de um elemento *Alu* insere uma seqüência de DNA em outro local do genoma. Tanto perdas como ganhos de bandas ocorreram nos tecidos tumorais, porém a ausência de bandas nos tumores foi praticamente o dobro. Cada paciente apresentou em média 1,35 ± 1,60 ganho de bandas no tecido tumoral e 2,64 ± 1,64 perda de bandas. Desse modo, os resultados sugerem que nas amostras de câncer de mama deleções são alterações genéticas mais freqüentes que amplificações, duplicações ou inserções gênicas.

Este trabalho mostrou que os dois métodos testados são eficientes na detecção de mudanças que ocorrem durante a progressão de um câncer de mama, o método de AIMS detectando alterações epigenéticas e a *Alu*-PCR detectando alterações estruturais, isto é, eventos de deleções e inserções.

Muitos estudos têm sido realizados para se encontrar padrões de metilação, específicos de DNA cancerígeno, em fluídos corporais, através da detecção de DNA flutuante liberado de células tumorais mortas, no sangue. Tem sido reportado que mudanças na metilação do DNA ocorrem no início da carcinogênese e, portanto, são potencialmente bons indicadores da existência da doença (Laird, 1997), mesmo antes de grandes alterações genéticas, como deleções e inserções ocorrerem. Assim o método de AIMS ajudaria na identificação desses padrões de metilação encontradas em células malignas. Porém, muitos estudos ainda serão necessários para se estabelecer um padrão de metilação presente em tecidos tumorais.

Como na maioria dos casos se detectada a doença em estágios mais avançados, a técnica de *Alu*-PCR também tem se mostrado como uma ferramenta importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tecidos tumorais e na identificação de genes responsáveis pela progressão do

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

tumor e metástase. Além de poder auxiliar no direcionamento para um tratamento mais adequado para cada paciente.

O perfil do *Alu* em pacientes com metástase intrapulmonar e com metástase intra e extrapulmonar combinadas demonstraram diferenças nos padrões de bandas alélicas entre o DNA extraído de tecido tumoral primário, tecido tumoral de metástase e tecido normal da mesma paciente. Nosso estudo em pacientes com câncer de mama, também, indicou diferenças nos padrões de bandas do DNA extraído de tecido tumoral, do tecido adjacente ao tumor e do sangue periférico. Esse método substitui com vantagem os testes tradicionais de instabilidade de microssatélite usados para análise de tecidos tumorais, pois estes protocolos envolvem múltiplos conjuntos de *primers* e podem não ser específicos para um dado tipo de tumor não sendo adequados como um método de investigação de rotina em laboratórios clínicos (Furmaga *et al.*, 2003). E um método com alta sensibilidade e prático, pois utiliza um único *primer* e pode ser aplicado em todos tipos de tumores, como também pode ser realizado em amostras contendo baixas concentrações de DNA.

Como ambos os métodos são recentes, necessitam de mais estudos decorrentes de aplicação em maior número de amostras para tentar se encontrar um padrão seguro de marcações genéticas e epigenéticas que ocorrem em tumores específicos e, também, relacionar determinadas variações com o grau de desenvolvimento do tumor. Mas, ambos tornam possível e relativamente rápido identificar mudanças que ocorrem em células neoplásicas. Como cada método identifica variações que ocorrem nas células neoplásicas de naturezas diferentes, genéticas e epigenéticas, a utilização de ambos pode permitir a caracterização dos eventos complexos que ocorrem na evolução da carcinogênese.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

VI. Conclusões

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1- O método de AIMS modificado possibilita a obtenção de *fingerprints* reprodutíveis em amostras de DNA extraído de tecidos mamários frescos, bem como permite identificar mudanças epigenéticas em DNA extraído de amostras de tumores de mama conservadas em blocos de parafina;

2- As freqüências médias de seqüências hipermetiladas e hipometiladas em câncer de mama foram superiores àquelas de amostras de pacientes com câncer colorretal. As diferenças podem ser devidas à natureza dos dois tumores, ou à qualidade do DNA gerado pela dissecção do tecido tumoral emblocado;

3- O método *Alu*-PCR é adequado para a investigação de variações genéticas que ocorrem em câncer de mama;

5- Deleções de seqüências foram as alterações genéticas mais freqüentes detectdas em câncer de mama por meio do método *Alu*-PCR;

6- Os métodos *Alu*-PCR e AIMS, modificados, são adequados para detectar alterações genéticas e epigenéticas em câncer de mama.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

VII. Referências Bibliográficas

AALTONEN, L. A.; PELTOMAKI, P.; LEACH, F. S.; SISTONEN, P.; PYLKKANEN, L.; MEEKLIN, J. P.; JARVINEN, H.; POWELL, S. M.; JEN, J.; HAMILTON, S. R.; *et al.* Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science**, v. 260, p. 212 - 816, 1993.

ADAMS, J. W.; KAUFMAN, R. E.; KRETSCHMER, P. J.; HARRINSON, M.; NIENHUIS, A. W. A family of long reiterated DNAs sequences, one copy of with is next to the human beta globin gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 8, p. 6113 – 6128, 1980.

ADORJAN, P.; *et al.* Tumor class prediction and discovery by microarray-based DNA analysis. **Nucleic Acids Res.** , v. 30, E21, 2002.

AHUJA, N.; LI, Q.; MOHAN, A. L.; BAYLIN, S. B.; ISSA, J. P. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. **Cancer Research**, v. 58, p. 5489 – 5494, 1998.

ALVES, G.; TATRO, A.; FANNING, T. Differential methylation of human *LINE*-1 retrotransposons in malignant cells. **Gene**, v. 176, p. 39 – 44, 1996.

ANTEQUERA, F.; BOYES, J.; BIRD, A. High levels of *de novo* methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. **Cell** , v. 62, p. 503 – 514, 1990.

BASIK, M.; STOLER,D. L.; KONTZOGLOU, K. C.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; PETRELLI, N. J.; ANDERSON, G. R. Genomic instability in sporadic colorectal cancer quantitated by inter sequence repeat PCR analysis. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 18, p. 19 – 39, 1997.

BASSAM, B. J.; CAETANO-ANOLLÉS, G. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Appl. Biochem. Biotechmol.** , v. 42, p. 181 – 188, 1993.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; VERTINO, P. M.; ISSA, J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. **Adv. Cancer Res.**, v. 72, p. 141 – 196, 1998.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermetylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet.**, v. 16, p. 168 – 17 4, 2000.

BECKER, K. G.; SWERGOLD, G. D.; OZATO, K.; THAYER, R. E. Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human *LINE*-1 transposable element. **Hum. Mol. Genet.**, v. 2, p. 1697 – 1702, 1993.

BERNARDINO, J.; ROUX, C.; ALMEIDA, A.; VOGT, N.; GIBAUD, A.; GERBAULT-SEUREAU, M.; MAGDELENAT, H.; BOURGEOIS, C. A.; MALFOY, B.; DUTRILLAUX, B. DNA hypomethylation in breast cancer: na independent parameter of tumor progression? **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 97, p. 83 – 89, 1997.

BIRD, A.; WOLFFE, A. P. Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. **Cell**, v. 99, p. 451 – 454, 1999.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.**, v. 16, p. 6 – 21, 2002.

BOLAND, C. R.; RICCIARDIELLO, L. How many mutations does it take to make a tumor? **PNAS**, v. 96, p. 14675 – 14677, 1999.

BREIVIK, J.; GAUDERNACK, G. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. **Cancer Biology**, v. 9, p. 245 – 254, 1999.

BURTON, F. H.; LOEB, D. D.; VOLIVA, C.; MARTIN, S. L.; EDGELL, M. H.; HUTCHINSON, C. A. III. Conservation throughout mammalia and extensive protein-encoding capacity of highly repeated DNA long interspersed sequence one. **J. Mol. Biol.**, v. 187, p. 291 – 304, 1986.

CARARETO, C. M. A.; ESTÉCIO, M. R. H.; TAJARA, E. H. Elementos transponíveis e doenças humanas: da instabilidade genômica à carcinogênese. **HB Científica**, v. 8, p. 113 – 125, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

CATTEAU, A.; HARRIS, W. H.; XU, C. F.; SOLOMON, E. Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics. **Oncogene.** v. 18, p . 1957 – 1965, 1999.

CATTEAU, A.; MORRIS, J. R. *BRCA1* methylation: a significant role in tumor development? **Cancer Biology**, v. 12, p. 359 – 371, 2002.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; CAMPOS-BICUDO, H. E. M. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in na embroidering hoop. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 15, p. 201- 203, 1992.

CHAN, M.F.; *et al*. Reduced rates of gene loss, gene silencing, and gene mutation in Dnmt-1-deficient embryonic stem cells. **Mol. Cell Biol.,** v. 21, p. 7587 – 7600, 2001.

CHAPMAN, V. M.; HIROTSUNE, S.; OKAZAKI, Y.; HATADA, I.; MUKAI, T.; KAWAI, J.; HIRASAWA, T.; NISHITANI, Y.; WATANABE, S.; SHIROISHI, T.; MORIWAKI, K.; MATSUDA, Y.; MANLY, K.; ELLIOT, R.; HAYASHIZAKI, Y. In: **CHS meeting on Genome Mapping and Sequencing** , Abstract, 247, 1992.

COSTELLO, J. F.; FRUHWSLD, M. C.; SMIRAGLIA, D. J.; *et al*. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumor-type-specific patterns. **Nature Genet.**, v. 24, p. 132 – 138, 2000.

COUNTS,J. L.; GOODMAN, J. I. Hypomethylation of DNA: a possible epigenetic mechanism involved in tumor promotion. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 391, p. 81 – 101, 1995.

CROSS, S. H.; CHARLTON, J. A.; NAN, X.; BIRD, A. P. Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. **Nature Genet.**, v. 6, p. 236 – 244, 1994.

DEININGER, P. L.; BATZER, M. A. *Alu* repeats and human disease. **Mol. Gen. Metab.**, v. 67, p. 183 – 193, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

DUTRILLAUX, B. Pathways of chromosome alteration in human epithelial cancers. **Adv. Cancer Res.,** v. 67, p. 59 – 82, 1995.

EADS, C. A.; *et al.* Epigenetic patterns in the progrssion of esophageal adenocarcinoma. **Cancer Research**, v. 61, p. 3410 – 3418, 2001.

ESTELLER, M.; CORN, P. G.; URENA, J. M.; *et al* . Inactivation of Glutathione S-Transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Research**. v. 58, p. 4515 – 4518, 1998.

ESTELLER, M.; FRAGA, M. F.; GUO, M.; *et al.* DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. **Human Molecular Genetics**. v. 10, p. 3001 – 3007, 2001.

ESTELLER, M.; CORN, P. G.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Research** , v. 61, p. 3225 – 3229, 2001.

ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, p. 5427 – 5440, 2002.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, p. 89 – 92, 1983.

FEINBERG, A. P.; GEHRKE, C. W.; KUO, K. C.; EHRLICH, M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. **Cancer Research**, v. 48, p. 1159 – 1161, 1988.

FENG, Q.; MORAN, J. V.; KAZAZIAN, H. H. Jr; BOEKE, J. D. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. **Cell**, v. 87, p. 905 – 916, 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 2º ed., Brasília, DF, Embrapa -Cenargen, 1996.

FISHEL, R.; LESCOO, M. K.; RAO, M. R.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; GARBER, J.; KANE, M.; KOLODNER, R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v. 75, p. 1027 – 1038, 1993.

FLORL, A. R.; LÖWER, R.; SCHMITZ-DRÄGER, B. J.; SCHULZ, W. A. DNA methylation and expression of *LINE*- 1 and *HERV*-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 80, p. 1312 – 1321, 1999.

FRIGOLA, J.; RIBAS, M.; RISQUES, R. M.; PEINADO, M. A. Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS). **Nucleic Acids Research**, v. 30, nº 7, e28, 2002.

FROMMER, M.; MC DONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5 -methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 1827 – 1831, 1992.

FURMAGA, W. B.; RYAN, J. L.; COLEMAN, W. B.; COLE, S. R.; TSONGALIS, G. J. *Alu* profiling of primary and metastatic nonsmall cell lung cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 74, p. 224 – 229, 2003.

FURMAGA, W. B.; COLE, S. R.; TSON GALIS, G. J. The use of *Alu* -PCR to distinguish between typical pulmonar carcinoids versus classic midgut carcinoids. **Int. J. Oncol.**, v. 24, p. 223 – 226, 2004.

FUTSCHER, B. W.; *et al*. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nature Genet.** , v. 31, p. 175 – 179, 2002.

GAMA-SOSA, M. A.; SLAGEL, V. A.; TREWYN, R. W.; OXENHANDLER, R.; KUO, K. C.; GEHRKE, C. W.; EHRLICH, M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res.** , v. 11, p. 6883 – 6894, 1983.

GITAN, R. S.; SHI, H.; CHEN, C. M. ; YAN, P. S.; HUANG, T. H. Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for High-throughput methylation analysis. **Genome Res.**, v. 12, p. 158 – 164, 2002.

GONZALEZ-ZULUETA, M.; BENDER, C.M.; YANG , A. S. NGUYEN, T.; BEART, R. W.; VAN TORNOUT, J. M.; JONES, P. A. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Research**, v. 55, p. 4531 – 4535, 1995.

GONZALGO, M. L.; JONES, P. A. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). **Nucleic Acids Research** , v. 25, p. 2529 – 2531, 1997.

GONZALGO, M. L.; LIANG, G.; SPRUCK III, C. H.; ZINGG, J. M.; RIDEOUT III, W. M.; JONES, P. A. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. **Cancer Research**, v. 57, p. 594 – 599, 1997.

GREENWOOD, A. D.; BURKE, D.T. Single nucleotide primer extension: quantitative range, variability, and multiplex analysis. **Genome Res.**, v. 6, p. 336 –348, 1996.

GRAFF, J. R.; HERMAN, J. G.; LAPIDUS, R. G.; et al. E -cadherin expression is silenced by DNA hypermethyl ation in human breast and prostate carcinomas. Cancer Research. v. 55, p. 5195 – 5199, 1995.

HATA, K.; SAKAKI, Y. Identification of critical sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. **Gene**, v. 189, p. 227 – 234, 1997.

HAYASHIZAKI, Y.; HATADA, I.; HIROTSUNE, S.; OKAZAKI, Y.; KOMATSUBARA, H.; MUKAI, T.; KAWAI, J.; HIRASAWA, T.; NISHITANI, Y.; WATANABE, S.; MANLY, K.; ELLIOT, R.; TAYLOR, B.; CHAPMAN, V. M. In: **CHS meeting on Genome Mapping and Sequencing**, Abstract, 120, 1992.

HAYASHIZAKI, Y.; HIROTSUNE, S.; OKAZAKI, Y.; HATADA, I.; SHIBATA, H.; KAWAI, J.; HIROSE, K.; WATANABE, S.; FUSHIKI, S.; WADA, S.; SUGIMOTO, T.; KOBAYAKAWA, K.; KAWARA, T.; KATSUKI, M.; SHIBUYA, T.; MUKAI, T. Restriction landmark genomic scanning meted and its various a pplications. **Electrophoresis**, v. 14, p. 251 – 258, 1993.

HAYATSU, H. Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents. **Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, ed. Cohen, W. E. (Academic, New York), v. 16, p. 75 – 124, 1976.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay of CpG islands. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 93, p. 9821 – 9826, 1996.

HERMAN, J. G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. **Seminars in Cancer Biology**. v. 9, p. 359 – 367, 1999.

HIRAGURI, S.; GODFREY, T.; NAKAMURA, H.; *et al.* Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. **Cancer Research**. v. 58, p. 1972 – 1977, 1998.

HIROTSUNE, S.; HATADA, I.; KOMATSUBARA, H.; NAGAI, H.; KUMA, K.; KOBAYAKAWA, K.; KAWARA, T.; NAKAGAWARA, A.; FUJII, K.; MUKAI, T.; HAYASHIZAKI, Y. New approach for detection of amplification in cancer DNA using restriction landmark genomic scanning. **Cancer research,** v. 52, p. 3642 – 3647, 1992.

HOAL-VAN HELDEN, E. G.; VAN HELDEN, P. D. Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs. **Mutat. Res.**, v. 219, p. 263 – 266, 1989.

HUANG, T. H.; PERRY, M. R.; LAUX, D. E. Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. **Hum. Mol. Genet.**, v. 8, p. 459 – 470, 1999.

HUTCHINSON, C. A.; HARDIES, S. C.; LOEB, D. D.; SHEHEE, W. R.; EDGELL, M. H. *LINE*s and related retroposons: long interspersed repeated sequences in the eukaryotic genome. **In Berg, D, Howe M** , ed. Mobile DNA. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 593 – 617, 1989.

HWU, H. R.; ROBERTS, J. W.; DAVIDSON, E. H.; BRITEN, R. J. Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 3875 – 3879, 1986.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

IONOV, Y.; PEINADO, M. A.; MALKHOSYAN, S.; SHIBATA, D.; PERUCHO, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated seque nces reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, v. 363, p. 558 – 561, 1993.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em http:// www.inca.gov.br. Acesso em: novembro 2003.

ISSA, J. P.; *et al.* Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nature Genet.** , v. 7, p. 536 – 540, 1994.

JONES, P. A. DNA methylation errors and cancer. **Cancer Research**, v. 56, p. 2463 – 2467, 1996.

JONES, P. A.; WOLKOWICZ, M. J.; RIDEOUT, W. M.; GONZALES, F. A.; MARZIASZ, C. M.; COETZEE, G. A.; TAPSCOTT, S. J. *De novo* methylation of the MyoDI CpG island during the establishment of immortal cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 6117 – 6121, 1990.

JONES, P. A.; LAIRD , P. W. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genet.** , v. 21, p. 163 – 167, 1999.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews** , v. 3, p. 415 – 428, 2002.

JÜRGENS, B.; SCHMITZ-DRÄGER, B. J.; SCHULZ, W. A . Hypomethylation of *L*1 *LINE* sequences prevailing in human urothelial carcinoma. **Cancer Research,** v. 56, p. 5698 – 5703, 1996.

KARPF, A. R.; JONES, D. A. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. **Oncogene** , v. 21, p. 5496 – 5503, 2002.

KAZAZIAN, H. H. JR; GOODIER, J. L. LINE Drive: retrotransposition and genome instability. **Cell**, v. 110, p. 277 – 280, 2002.

KAWAI, J.; HIROTSUNE, S.; HIROSE, K.; FUSHIKI,; WATANABE, S.; HAYASHIZAKI, Y. Methylation profiles of genomic DNA of mouse development brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. **Nucleic Acids Research,** v. 21, p. 5604 – 5608, 1993.

KRIAUCIONIS, S.; BIRD, A. DNA methylation and Rett syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, v. 12, Review Issue 2, p. R221 – R227, 2003.

KUPPUSWAMY, M. N.; HOFFMANN, J. W.; KASPER, C. K.; SPITZER, S. G.; GROCE, S. L.; BAJAJ, S. P. Single nucleotide primer extension to detect genetic diseases: experimental application to hemophilia B (factor IX) and cystic fibrosis genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 1143 – 1147, 1991.

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews**, v. 3, p. 253 – 266, 2003.

LAPIDUS, R. G.; NASS, S. J.; BUTASH, K. A.; *et al.* Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. **Cancer Research.** v. 58, p. 2515 – 2519, 1998.

LEACH, F. S.; NICOLAIDES, N. C.; PAPADOPOULOS, N.; LIU, B.; JEN, J.; PARSON, R.; PELTOMAKI, P.; SISTONEN, P.; AALTONEN, L. A.; NYSTROM-LAHLI, M., et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell,** v. 75, p. 1215 – 1225, 1993.

LEHMANN, U.; LÄNGER, F.; FEIST, H.; *et al.* Quantitative Assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. **American Journal of Pathology.** v. 160, p. 605 – 612, 2002.

LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOLGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, p. 643 – 649, 1998.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Rev. Genet.**, v. 3, p. 662 – 673, 2002.



MATHIAS, S. L.; SCOTT, A.; KAZAZIAN, H. H. Jr; BOEKE, J. D.; GABRIEL, A. Reverse transcriptase encoded buy a human transposable element. **Science**, v. 254, p. 1808 – 1810, 1991.

MERLO, A.; HERMAN, J. G.; MAO, L.; LEE, D. J.; GABRIELSON, E.; BURGER, P. C.; BAYLIN, S. B.; SIDRANSKY, D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. **Nat. Med.**, v. 1, p. 686 – 692, 1995.

NELSON, D. L; BALLABIO, A.; VICTORIA, M. F.; PIERETTI, M.; BIES, R. D.; GIBBS, R. A.; MALEY, J. A.; CHINAULT, A. C.; WEBSTER, T. D. *Alu*-primed polymerase chain reaction for assignment of 110 yeast artificial chromosome clones from the human X chromosome: identification of clones associated with a disease locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6157 – 6161, 1991.

NOWELL, P. C. Genetic alterations in leukemias and lymphomas: impressive progress and continuing complexity. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 94, p. 13 – 19, 1997.

OTTAVIANO, Y. L.; ISSA, J. P.; PARL, F. F.; *et al.* Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. **Cancer Research.** v. 54, p. 2552 – 2555, 1994.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. I.; DEVESA, S. S.; Cancer burden in the year 2000. The global picture. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. S4 – S66, 2001.

PEGRAM, M.; *et al.* Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. **J. Clin. Oncol.,** v. 16, p. 2659 – 2671, 1998.

PEINADO, M. A.; MALKHOSYAN, S.; VELAZQUEZ, A.; PERUCHO, M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10065 – 10069, 1992.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

PELTOMAKI, P.; AALTONEN, L. A.; SISTONEN, P.; PYLKKANEN, L.; MECKLIN, J. P.; JARVINEN, H.; GREEN, J. S.; JASS, J. R.; WEBER, J. L.; LEACH, F. S.; *et al*. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**, v. 260, p. 810 – 812, 1993.

PLASS, C. Cancer epigenomics. **Hum. Mol. Genet.**, v. 11, p. 2479 – 2488, 2002.
ROBERTSON, K. D.; JONES, P. A. DNA me thylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 461 – 467, 2000.

ROWOLD, D. L.; HERRERA, R. J. *Alu* elements and the human genome. **Genetica**, v. 108, p. 57 – 72, 2000.

SADRI, R.; HORNSBY, P. J. Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 5058 – 5059, 1996.

SANCHEZ-CESPEDES, M.; ESTELLER, M.; WU, L.; NAWROZ-DANISH, H.; YOO, G. H.; KOCH, W. M.; JAMES, J.; HERMAN, J. G.; SIDRANSKY, D. Gene promo ter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Research**, v. 60, p. 892 – 895, 2000.

SASAKI, M.; ANAST, J.; BASSETT, W.; *et al*. Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. **Biochem. And Biophysical Res. Communications**, v. 309, p. 305 – 309, 2003.

SASSAMAN, D. M.; dOMBROSKI, B. A.; MORAN, J. V.; KIMBERLAND, M. L.; NASS, T. P.; DEBERARDINIS, R. J.; GABRIEL, A.; SWERGOLD, G. D.; KAZAZIAN, H. H. Jr. Many human L1 elements are capable of retrotransposition. **Nature Genet.**, v. 16, p. 37 – 43, 1997.

SHAPIRO, R.; BRAVERMAN, B.; LOUIS, J. B.; SERVIS, R. E. Nucleic acid reactivity and conformation II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. **J. Biol. Chem.** , v. 248, p. 4060 – 4064, 1973.

SEEGER, R. C.; *et al* . Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. **N. Engl. J. Med.**, v. 313, p. 1111 – 1116, 1985.



SINGER, M. F.; THAYER, R. E.; GRIMALDI, G.; LERMAN, M.I.; FANNING, T. G. Homology between the KpnI primate and BamH1 (M1F-1) rodent families of long interspersed repeated sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 11, p. 5739 – 5745, 1983.

SINGER-SAM, J.; LE BOM, J. M.; DAI, A.; RIGGS, A. D. A sensitive, quantitative assay for measurement of allele – specific transcripts differing by a single nucleotide. **PCR Methods Appl.**, v. 1, p. 160 – 163, 1992.

STENGER, J. E.; LOBACHEV, K. S.; GORDENIN, D.; DARDEN, T. A.; JURKA, J.; RESNICK, M. A. Biased distribution of inverted and direct *Alus* in the human genome, implications for insertion, exclusion, and genome stability. **Genome Res.**; v. 11, p. 12 – 27, 2001.

STRICHMAN-ALMASHANU, L. Z.; *et al.* A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. **Genome Res.**, v. 12, p. 543 – 554, 2002.

STROUT, M. P.; MARCUCCI, G.; BLOOMFIELD, C. D.; CALIGIURI, M. A. The partial tandem duplication of *ALL*-1 (MLL) is consistently generated by *Alu*-mediated homologous recombination i n acute myeloid leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 2390 – 2395, 1998.

SUGIMURA, T.; TERADA, M.; YOKOTA, J.; HIROHASHI, S.; WAKABAYASHI, K. Multiple genetic alterations in human carcinogenesis. **Environ. Health Perspect.** , v. 100, p. 9 – 20, 1992.

SUMINAGA, R.; TAKESHIMA, Y.; YASUDA, K.; SHIGA, N.; NAKAMURA, H.; MATSUO, M. Non-homologous recombination between *Alu* and *LINE*-1 repeats caused a 430-kb deletion in the dystrophin gene: a novel source of genomic instability. **J. Hum. Genet.**, v. 45, p. 3 31 – 336, 2000.

SVED, J.; BIRD, A. The expected equilibrium of the CpG dinucleotide in vertebrate genomes under a mutation model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4692 – 4696, 1990.

SZABO, P. E.; MANN, J. R. Allele -specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development implications for imprintingmechanisms. **Genes Dev.**, v. 9, p. 3097 – 3108, 1995.

TAKAI, D.; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 3740 – 3745, 2002.

THAYER, R. E.; SINGER, M. F.; FANNING, T. G. Undermethylation of specific *LINE*-1 sequences in human ce lls producing a *LINE*-1-encoded protein. **Gene**, v. 133, p. 273 – 277, 1993.

THIBODEAN, S. N.; BREN, G.; SCHAID, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science**, v. 260, p. 816 – 819, 1993.

TOYOTA, M.; HO, C.; AHUJA, N.; JAIR, K. W.; LI, Q.; OHE-TOYOTA, M.; BAYLIN, S. B.; ISSA, J. P. J. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. **Cancer Research**, v. 59, p. 2307 – 2312, 1999.

TSONGALIS, G.; COLEMAN, W.; ESCH, G.; SMITH, G.; KAUFMAN, D. Identification of Human DNA in complex biological samples using the *Alu* polymerase chain reaction. **J. Forensie Sci.**, v. 38, p. 961 – 967, 1993.

VIRMANI, A. K. *et al*. Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 11, p. 291 – 297, 2002.

WANG, R. Y. –H.; GEHRKE, C. W.; EHRLICH, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. **Nucleic Acids Res.**, v. 8, p. 4777 – 4790, 19 80.

WANG, S. I.; *et al*. Somatic mutation of PTEN in glioblastoma multiforme. **Cancer Research**, v. 57, p. 4183 – 4186, 1997.

WARREN, W. D. Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human retrotransposon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 7810 – 7816, 1997.

WELSH, J.; MC CLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, **Nucleic. Acids. Res.**, v. 18, p. 7213 – 7218, 1990.

WEICHENRIEDER, O.; STEHLIN, C.; KAPP, U.; BIRSE, D. E.; TIMMINS, P. A.; STRUB, K.; CUSACK, S. Hierarchical assembly of the *Alu* domain of the mammalian signal recognition particle. **RNA – A Publication of the Rna Society**, v. 7, p. 731 – 740, 2001.

WOODCOCK, D. M.; LAWLER, C. B.; LINSENMEYER, M. E.; DOHERTY, J. P.; WARREN, W. D. Asymmetric Methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human *L*1 retrotransposon. **The Jounal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 7810 – 7816, 1997.

XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Research** , v. 25, p. 2532 – 2534, 1997.

YAN, P. S.; CHEN, C. M.; SHI, H.; RAHMATPANAH, F.; WEI, S. H.; CALDWELL, C. W.; HUANG, T. H. Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG island microarrays. **Cancer Research**, v. 61, p. 8375 – 8380, 2001.

YAN, P. S. *et al*. Applications of CpG island microarrays for high-throughput analysis of DNA methylation. *J. Nutr.*, v. 132, p. 2430S – 2434S, 2002.

YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends Genet.** , v. 13, p. 335 – 340, 1997.

VIII. Resumo

No presente trabalho testou-se a utilização de dois métodos modificados para identificar variações epigenéticas e genéticas em câncer de mama - os métodos de AIMS e *Alu*-PCR -, respectivamente. As modificações propostas ao método de AIMS foram a utilização de dNTPs não-marcados com isótopos radioativos e a utilização de gel de poliacrilamida não-desnaturante para visualização dos amplificados por PCR. Testou-se também a aplicabilidade do método para amostras de carcinomas invasivos, e de seus tecidos adjacentes, conservadas em blocos de parafina. As amostras de DNA extraído de tumores conservados em parafina produziram *fingerprints* menos legíveis (71,78% de reprodutibilidade) que as de DNA obtido de tecido normal recém-extraído (quase 100% de reprodutibilidade). Embora a reprodutibilidade não tenha sido total em amostras emblocadas, foi possível identificar, com resultado reprodutível, seqüências hipermetiladas (5,17 em média, por paciente) e hipometiladas (4,17 em média, por paciente) nos tumores de mama. O método *Alu*-PCR foi testado com apenas uma modificação, a utilização de gel de poliacrilamida, para detectar alterações genéticas em câncer de mama. Para isso, foram utilizadas amostras, recém-extraídas, de carcinomas invasivos, de seus tecidos normais adjacentes e de sangue de pacientes submetidas à cirurgia para remoção do câncer. O método mostrou-se adequado para a identificação de alterações genéticas neste tipo de neoplasia. Foram observados ganhos e perdas de bandas específicas nos tecidos neoplásicos, porém a freqüência de perdas de bandas (deleções de seqüências) foi praticamente o dobro da de ganhos (amplificações, duplicações ou inserções de seqüências). A freqüência média de deleções nas amostras dos tumores em comparação aos tecidos normais adjacentes e sangue foi de 2,64 bandas ausentes por paciente. A freqüência média de amplificações, duplicações ou inserções foi de 1,35 banda extra por paciente.

Palavras-chave: método de AIMS modificado; método *Alu*-PCR; alterações epigenéticas; alterações genéticas; câncer de mama.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

IX. Abstract

The present study aimed at evaluating two modified methods to identify epigenetic and genetic changes in breast cancer using AIMS and *Alu*-PCR methods respectively. The changes proposed to AIMS were the use of non-radioactive dNTPs and of non-denaturing polyacrylamide gels. The applicability of AIMS method to analyze paraffin-embedded samples of invasive carcinomas and their adjacent areas was also tested. DNA from paraffin-embedded samples produced less readable fingerprints (71.78% of reproductibility) than normal tissues fresh specimens DNA (almost 100% of reproductibility). Although the reproductibility had not been total in paraffin-embedded samples, it was possible to identify highly reproductible hypermethylated (average of 5.17 per patient) and hypomethylated (average of 4,17 per patient) sequences in breast cancer. The *Alu*-PCR method with polyacrilamide gels was evaluated to detect genetic changes in breast cancer. Samples of fresh specimens of invasive carcinomas, their adjacent normal areas and blood from patients submitted to surgery to remove the cancer were used to perform the assays. The method had shown to be sensitive to screen genetic changes in breast cancer. Losses and gains of specific bands were observed in the cancer cells, however the frequency of losses (sequences deletions) was nearly twice bigger than gains (amplifications, duplications or insertions of sequences) of bands. The deletions average frequency in tumor samples compared to adjacent normal areas and to blood was 2.64 absent bands per patient. The amplifications, duplications and insertions average frequency was 1.35 extra band per patient.

Key-words: modified AIMS; *Alu*-PCR method; epigenetic modification; genetic changes; breast cancer.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
São José do Rio Preto, 09/01/2004.

_____

Flávia Cal Sabino

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18