

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Análise de metilação da região promotora do gene

***RASSF1* em linhagens celulares derivadas de**

carcinomas mamários

Gimena Aguiar

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (Campus de Botucatu) para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

**Botucatu/SP
2009**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

NEPIGEN

Laboratório de estudos das alterações epigenéticas em neoplasias humanas

Análise de metilação da região promotora do gene

***RASSF1* em linhagens celulares derivadas de**

carcinomas mamários

Gimena Aguiar

Orientadora: Cláudia Aparecida Rainho

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (Campus de Botucatu) para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

**Botucatu/SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Aguiar, Gimena.

Análise de metilação da região promotora do gene *RASSF1* em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários / Gimena Aguiar. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Cláudia Aparecida Rainho

1. Mamas - Câncer - Aspectos genéticos 2. Genética

Palavras-chave: Carcinoma mamário; Epigenética; Metilação; qMS; *RASSF1*

Agradecimentos

À toda minha família, especialmente ao meu pai Jorge, minha mãe Cristiane e meu irmão Leonardo, que sempre me apoiaram em todas decisões e torceram muito pela realização desse projeto.

À Vanessa, tia e companheira de casa, que participou juntamente de todas as novidades, felicidades e dificuldades ao longo desse ano.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Érika, Daniela, Priscila e Joana, que me ensinaram a arte de dominar o pipetador e pensar ao mesmo tempo. Agradeço especialmente à Érika, que por todo o tempo foi como uma professora nata: aliviou todas as minhas dúvidas terríveis de forma clara, atenciosa e paciente!

Ao Marcelo, que, mesmo morando em outra cidade, esteve sempre presente, participando das decisões e novidades, fazendo eu me sentir confortada e tentando esquecer a distância. Te adoro e admiro muito!

À Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho, que, durante os dois anos e meio que fiquei no laboratório, me ensinou os primeiros passos da vida científica de forma sábia e madura. Levarei comigo muitos ensinamentos.

À Dra. Luciane Regina Cavalli, que colaborou cedendo todas as linhagens celulares, fundamentais para a concretização desse estudo.

Ao CNPq e à Fapesp, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	5
INTRODUÇÃO	6
Aspectos gerais do câncer de mama.....	6
A genética no câncer.....	8
Alterações epigenéticas do câncer.....	9
Gene <i>RASSF1</i>	12
OBJETIVOS	15
Objetivos gerais	15
Objetivo específico.....	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
Linhagens celulares	16
Cultivo e tratamento celular	16
Extração do DNA genômico.....	17
Modificação do DNA genômico pelo bissulfito de sódio	17
Análise de metilação pela metodologia de MSP (Methylation-specific polymerase chain reaction).....	19
Otimização da técnica de qMSP (Methylation-specific polymerase chain reaction quantitativa em tempo real)	20
RESULTADOS	26
Tratamento celular.....	26
Análise de metilação por MSP (Methylation-specific polymerase chain reaction)	30
Otimização da técnica de qMSP (Methylation-specific polymerase chain reaction quantitativa em tempo real)	33
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia que mostra as maiores taxas de mortalidade entre as mulheres no Brasil, provavelmente pelo fato de que, na maioria dos casos, a doença é diagnosticada em estádios avançados, dificultando o sucesso do tratamento. Dessa forma, essa doença é considerada um problema crítico de saúde pública. O câncer é uma doença que se caracteriza por sucessivas alterações genéticas e epigenéticas que causam um crescimento e multiplicação celular desordenados. A hipermetilação da região promotora de genes específicos pode levar ao silenciamento gênico, um evento importante no processo da carcinogênese. Este estudo analisou o padrão de metilação da isoforma *RASSF1A* do gene *RASSF1* em linhagens celulares derivadas de carcinoma mamário. Esse gene está mapeado na região cromossômica 3p21.3 e, segundo dados da literatura, atua como supressor tumoral. O principal objetivo desse estudo foi investigar a presença de hipermetilação na região promotora desse gene em linhagens celulares de carcinomas mamários. Para a realização dessa análise foi empregada a metodologia de MSP (*Methylation-specific Polymerase Chain Reaction*) convencional e de qMSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction* quantitativa em tempo real). Todas as linhagens de carcinomas mamários analisadas no estudo (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-134 e SKBR3) apresentaram um padrão hipermetilado na região promotora do gene *RASSF1* corroborando com dados da literatura que relacionam a inativação desse gene à hipermetilação do promotor. Estes dados, associados aos obtidos em uma análise paralela realizada em nosso laboratório que demonstrou a re-expressão do gene *RASSF1* após o tratamento com o agente desmetilante 5-aza-2'-desoxicitidina, confirmam a regulação epigenética desse gene supressor tumoral.

INTRODUÇÃO

Aspectos gerais do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais diagnosticada entre as mulheres (Bai & Gust, 2009). Esta doença afeta em torno de 1,2 milhões de indivíduos a cada ano. Nos Estados Unidos, mais de 200.000 mulheres são diagnosticadas com câncer de mama anualmente, correspondendo a 30,4% dos casos novos de neoplasias (Fucito *et al*, 2008). No Brasil, esse tipo de câncer é o que mais causa mortes entre as mulheres. O número de casos novos esperados para o ano de 2010 é de 49.240. Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (67/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (28/100.000). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (16/100.000) (Brasil, Ministério da Saúde, INCA, 2009). Baseado na sua alta incidência, essa doença é considerada como um problema crítico de saúde pública (Hulvat *et al*, 2009).

O câncer de mama é uma doença heterogênea incluindo uma variedade de lesões que apresentam comportamentos clínicos distintos. Historicamente, as vias de progressão do câncer de mama foram definidas baseadas nas mudanças morfológicas demonstradas pelas células, onde células epiteliais normais podiam se transformar e progredir através de uma série de precursores morfológicos identificáveis (i.e., normal → hiperplasia do tipo usual → hiperplasia ductal atípica → carcinoma ductal *in situ* de baixo grau → carcinoma ductal *in situ* de alto grau → carcinoma invasivo) (Geyer *et al*, 2009). Atualmente, acredita-se que a carcinogênese mamária resulta do

acúmulo de alterações moleculares associadas às alterações morfológicas. Dessa forma, o câncer de mama é conhecido como uma doença multifatorial que resulta do acúmulo de alterações genéticas (Pérez-Lopéz *et al*, 2009) e epigenéticas (Hu & Poliak, 2008). A carcinogênese é tida como um processo constituído de várias etapas, começando com efeitos genotóxicos, etapa chamada de iniciação, seguida pelo aumento da proliferação celular, etapa conhecida como promoção (Parl *et al*, 2009) e pela progressão, que é caracterizada pela instabilidade genômica (Geyer *et al*, 2009).

Muitos fatores de risco foram descritos, sendo os principais: história de câncer de mama na família, menarca precoce, menopausa tardia associada ou não a obesidade, nuliparidade, ocorrência da primeira gravidez após os trinta anos, consumo de álcool e de tabaco (Fucito *et al*, 2008). Os estrógenos foram considerados os principais fatores de risco para esse tipo de câncer, porém alguns estudos não demonstram uma importância maior em relação aos outros fatores citados anteriormente (Parl *et al*, 2009). Apesar das controvérsias, estudos sugerem que um alto nível de vitamina D circulante no corpo relacionado ao excesso de exposição ao sol, assim como o tipo de alimentação, também podem contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (Pérez-Lopéz *et al*, 2009).

Avanços importantes na terapia e no diagnóstico fizeram com que diminuísse acentuadamente as taxas de mortalidade entre pacientes nos países desenvolvidos (Fucito *et al*, 2008). Porém, apesar de ser considerado atualmente um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de 61% (Brasil. Ministério da Saúde, INCA, 2009).

A mamografia proporciona o diagnóstico precoce do câncer de mama. Foi demonstrado que este exame diminui a taxa de mortalidade pelo câncer de mama nas mulheres entre 40 e 74 anos. Atualmente, esse é um assunto polêmico: um grupo de pesquisadores demonstrou recentemente que a mamografia não diminui as taxas de mortalidade nas mulheres entre 40 e 50 anos, mas que apenas as mulheres acima dos 50 anos se beneficiariam deste exame de rotina para a triagem de câncer de mama na população (Mandelblatt et al, 2009). Existe certa dificuldade na utilização da mamografia em mulheres mais novas que apresentam o tecido mamário denso. Dessa forma, uma alternativa é a realização do ultra-som mamário, que também consegue investigar tumores imperceptíveis no exame clínico (Hulvat *et al*, 2009). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional um exame mamográfico, pelo menos a cada dois anos, para mulheres de 50 a 69 anos e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau) recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir dos 35 anos (Brasil. Ministério da Saúde, INCA, 2009).

A genética do câncer

O primeiro impacto dos estudos genéticos e moleculares no câncer de mama remonta no final dos anos oitenta. Esses estudos forneceram dados importantes sobre vias de sinalização celular envolvidas na proliferação e sobrevivência celular, além de informações relacionadas ao estabelecimento do fenótipo transformado. Uma variedade de reguladores celulares importantes foi descoberta, como vias de sinalização

intracelular, receptores de fatores de crescimento, reguladores de apoptose e proteínas nucleares associadas com o controle e perda da regulação do ciclo celular (Fucito *et al*, 2008).

Dois grupos importantes de genes estão relacionados com o fenótipo maligno das neoplasias: os oncogenes e os genes supressores tumorais. Mutações nos proto-oncogenes devido à mutação em ponto, rearranjo ou amplificação resultam em ganho de função geralmente associada a altos níveis de expressão desses genes, passando a serem denominados de oncogenes (Todd *et al*, 1997; Gleich & Salamone, 2002). Embora a ativação de um único oncogene não seja suficiente para causar um fenótipo maligno, elas parecem ser iniciadores importantes do processo de carcinogênese.

Diferentemente dos oncogenes, que atuam de forma dominante, ou seja, exercem seu efeitos celulares com apenas uma mutação em um dos alelos, os genes supressores tumorais (GST) são inativados por mutações em ponto, deleções e rearranjos em ambos alelos (agem de forma recessiva em nível celular). Nesse caso, ocorre a perda de função de genes associados com o controle negativo do ciclo celular ou de resposta a danos do DNA (Todd *et al*, 1997).

Alterações epigenéticas no câncer

Embora as pesquisas em biologia molecular clássica se concentrem nas funções diretas das alterações genéticas como deleções e inserções, a epigenética mostra-se cada vez mais intrínseca à carcinogênese. A epigenética é comumente definida como uma mudança herdável e reversível na expressão gênica, não acompanhada por mudanças na sequência do DNA (Hinshelwood & Clark, 2008). As principais mudanças epigenéticas são a metilação do DNA e a modificação da cromatina, mecanismos esses que podem

permitir a relativa estabilidade das células fenotipicamente anormais (Hu & Poliak, 2008).

A metilação é uma modificação bastante estudada do DNA que está relacionada ao desenvolvimento normal de mamíferos, ao *imprinting* genômico e à inativação do cromossomo X. Entretanto, estudos recentes identificaram a hipermetilação com uma provável causa do desenvolvimento de várias formas de câncer. A metilação do DNA ocorre devido a ação das DNA-metiltransferases, que adicionam um radical metil no carbono 5 de citosinas seguidas por uma guanina (dinucleotídeo CpG), especialmente em ilhas CpGs localizadas na região promotora de genes específicos. Quando ocorre uma modificação do padrão de metilação, há uma repressão transcricional, podendo culminar com o silenciamento gênico (Worsham *et al*, 2006).

A metilação do DNA e a acetilação das histonas induzem o remodelamento da cromatina. As histonas formam nucleossomos, que são a unidade básica da estrutura da cromatina e compreendem um conjunto octamérico de histonas (duas cópias de cada tipo de histona: H2A, H2B, H3 e H4) envolto em 147 pares de bases de DNA (Park & Luger, 2006). A associação entre nucleossomos e o DNA é muito importante para regulação da expressão gênica, visto que causa o empacotamento do DNA e confere uma configuração condensada, de tal forma que não permite o acesso a diversos fatores de transcrição (Lee *et al*, 1993; Luger, 2006).

As modificações pós-traducionais das histonas H3 e H4 ocorrem principalmente em resíduos de lisina na cauda amino terminal da proteína. A acetilação dos resíduos de lisinas nas histonas é realizada pelas histonas acetiltransferases (HATs) enquanto que as histonas desacetilases (HDACs) podem causar a reversibilidade desse processo. A metilação também pode tomar o lugar nos resíduos de lisina e arginina presentes nas caudas das histonas H3 e H4 (Fucito *et al*, 2009).

A metilação dos resíduos de citosinas nos dinucleotídeos CpGs pode silenciar o promotor através do deslocamento de fatores de transcrição, como os complexos da RNA polimerase II. Até agora, quatro tipos de DNA metiltransferases (DNMT) que medeiam a metilação das ilhas CpGs foram identificadas: DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b (Fucito *et al*, 2009). A metilação do DNA também pode resultar em um recrutamento de proteínas que ligam-se a CpGs metiladas, denominadas de MBD (*methyl-CpG-binding domain proteins*), com as histonas desacetilases (HDACs) e histonas metiltransferases (HMTs) induzindo modificações epigenéticas coordenadas ao redor da cromatina (Ellis *et al*, 2009).

Um exemplo de gene que apresenta alterações epigenéticas relacionado ao câncer de mama é o *TP16* (p16^{INK4A}). A perda da regulação epigenética nesse gene também ocorre em lesões pré-malignas. Foi demonstrado que, alguns focos de amostras de tecido mamário que apresentavam células epiteliais morfologicamente normais, possuíam padrões anormais de metilação no gene *TP16*. Atualmente, esses focos são considerados como precursores de câncer, que podem promover um fenótipo maligno favorecendo a ocorrência de mudanças genéticas e/ou epigenéticas adicionais. Estudos demonstraram que o silenciamento desse gene está associado à hipermetilação de ilhas CpG, presentes na região promotora deste gene, o que ocorre nos estádios precoces da carcinogênese mamária (Hinshelwood & Clark, 2008).

Recentemente, o foco está na descoberta de novos biomarcadores que se apresentam epigeneticamente silenciados no início da carcinogênese. De forma interessante, quase metade dos genes supressores tumorais que causam câncer familiar devido a mutações, podem também ser inativados em associação com a hipermetilação do promotor em cânceres esporádicos (Hinshelwood & Clark, 2008).

Assim, considerando tantos estudos acerca da genética e epigenética no câncer de mama, e sabendo do potencial biomarcador de genes alterados epigeneticamente, é possível afirmar que eles levarão a uma maior especificidade e eficácia no diagnóstico, consequentemente aumentando a taxa de sobrevivência dos pacientes com câncer (Fucito *et al*, 2009).

Gene *RASSF1*

O gene supressor tumoral *RASSF1* (*Ras-association domain family 1*), que está localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p21.3), apresenta sete isoformas diferentes (*RASSF1A* até *RASSF1G*) que são geradas através do uso diferencial de dois promotores que estão a uma distância de 3,5 Kb e de *splicing* alternativo (Figura 1). Até o momento, porém, somente as isoformas *RASSF1A* e *RASSF1C* demonstraram relevância biológica. A isoforma *RASSF1A* é transcrita pelo promotor *upstream* e a isoforma *RASSF1C* pelo promotor *downstream* e ambos os promotores estão localizados em ilhas CpGs. Entretanto, somente o promotor *upstream* apresenta-se metilado em vários tipos de cânceres. Em tumores e em linhagens celulares tumorais, o transcrito da isoforma *RASSF1A* é frequentemente silenciado devido à metilação da ilha CpG presente no promotor. A re-expressão de *RASSF1A* em linhagens celulares leva a redução da taxa de proliferação e, ainda, foi demonstrado que ratos *knockout* para *RASSF1A* estão propensos a desenvolver câncer em idade avançada (Richter *et al*, 2009).

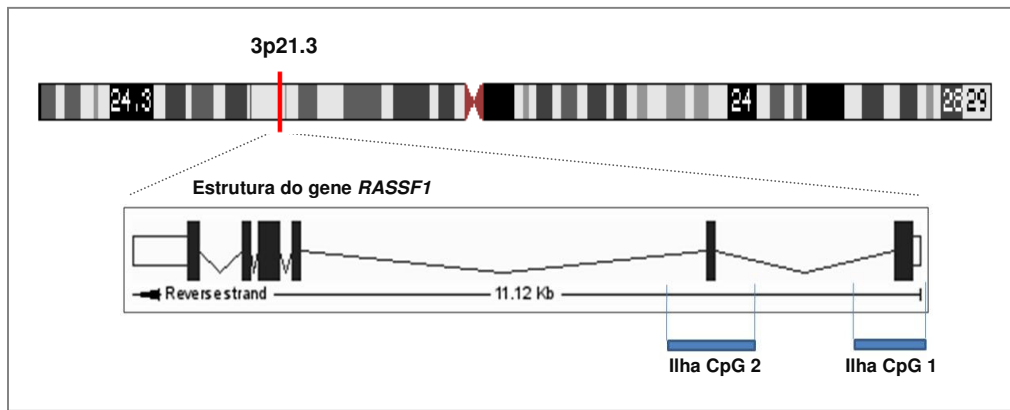


Figura 1: Localização, estrutura do gene *RASSF1* e a posição das ilhas CpGs. A ilha CpG 1 inclui a região promotora da isoforma *RASSF1A*.

O efeito supressor da proteína RASSF1A está relacionado a duas ações importantes: interrupção da indução do ciclo celular e apoptose. Acredita-se que a RASSF1A induz apoptose pela interação com Ras, *NORE1* (novo efetor de Ras 1, também conhecido como RASSF5) e o modulador de apoptose-1. A progressão mitótica é regulada na fase G₁/S pela interação da RASSF1A com o fator transcricional p120^{E4F} e inibição do acúmulo de ciclina D. A RASSF1A também induz parada do ciclo celular na fase G₂/M, pois não permite a ação da APC-Cdc20 ubiquitina ligase na degradação de ciclinas A e B. Além disso, o *RASSF1A* implica na modulação da dinâmica dos microtúbulos pela sua interação direta com microtúbulos e com proteínas intrínsecas associadas aos microtúbulos (Whang *et al*, 2009).

A metilação aberrante do promotor do gene *RASSF1A* é frequentemente detectada em vários tipos de tumores, incluindo câncer de mama, câncer cervical, câncer de cabeça e pescoço, câncer de cólon, câncer gástrico, carcinoma hepatocelular, neuroblastoma, glioblastoma, meduloblastoma e câncer de bexiga. (Pfeifer & Dammann, 2005). A metilação do *RASSF1A* é raramente encontrada em tecidos normais, porém a presença de metilação foi descrita em tecidos não cancerosos que estavam

adjacentes ao tumor analisado (Negraes et al, 2008). Esta metilação pode representar a infiltração de células tumorais no tecido sadio ou pode estar relacionado a um evento precoce que leva a carcinogênese (Pfeifer & Dammann, 2005).

Em adição aos estudos que relataram as altas frequências de metilação da região promotora do gene *RASSF1* em diversos tipos de cânceres humanos, recentemente, a hipermetilação da região promotora desse gene (associada ou não a perda de heterozigose (LOH) em 3p21.3) tem apontado para a importância das alterações dos padrões epigenéticos na inativação da transcrição, especialmente em carcinomas de mama, pulmão e neuroblastomas (Ito *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2007).

Este estudo é parte de um projeto maior que visa à caracterização epigenética de genes supressores tumorais mapeados em 3p21.3 (Auxílio Regular da Fapesp, Processo no. 2007/59110-9) e à correlação entre os padrões de metilação do DNA, os níveis de expressão gênica e as modificações das histonas de genes mapeados próximos ao gene *RASSF1* em linhagens celulares tratadas e não tratadas com agentes desmetilantes e inibidores das desacetilases de histonas.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

Considerando a função biológica do gene *RASSF1A*, a densidade de ilhas CpGs observadas e as evidências em literatura que mostram a inativação em carcinomas humanos, este estudo foi proposto com a finalidade de investigar se o gene *RASSF1A* é inativado pela hipermetilação da ilha de CpG em linhagens celulares de carcinomas mamários.

Objetivo específico

Analisar o padrão de metilação da ilha de CpG do gene *RASSF1A* em linhagens celulares derivadas de carcinomas mamários pelas metodologias de *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction* (MSP) e *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction* quantitativa em tempo real (qMSP).

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens celulares

Foram utilizadas 5 linhagens de células epiteliais derivadas de carcinomas mamários que estão armazenadas em nitrogênio líquido no laboratório (**SKBR3**, **MCF7**, **MDA-MB-453**, **MDA-MB-231**, **MDA-MB-134**). Estas linhagens foram cedidas para tais estudos pela colaboração estabelecida com a Dra Luciane Regina Cavalli e compõem a coleção do *Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, Washington, USA*.

Cultivo e tratamento celular

As linhagens celulares encontram-se armazenadas em alíquotas de 1×10^6 céls/mL em meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10% de DMSO, mantidas em nitrogênio líquido. No momento do uso, as células foram descongeladas e cultivadas em monocamadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos (estreptomicina e penicilina) pH 7.4, em frascos de cultura de 25 cm² em estufa a 37°C e 5% CO₂. Ao atingirem o estado de confluência, as células foram sub-cultivadas em pelo menos três frascos. Após uma etapa de lavagem em solução de Hanks 1X, as mesmas foram removidas pelo uso de solução de 0,25% tripsina/EDTA.

O melhor protocolo de tratamento visando à re-expressão do gene *RASSF1* foi escolhido após a avaliação do efeito de diferentes concentrações das drogas 5-aza-2'-desoxicitidina (Aza) (1.0, 2.5 e 5.0µM), um agente desmetilante, e tricostatina A (TSA) (150, 300 e 450ng/mL), um inibidor das desacetilases de histonas. Além disso, foram

realizados diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas para o tratamento com Aza, seguido ou não de 24 horas de exposição à TSA) analisando as taxas de proliferação celular.

Extração do DNA genômico

Após o cultivo celular e obtenção dos *pellets* de células, o DNA foi obtido por meio da digestão com proteinase K (concentração final de 10µg/mL) em 200µL de tampão de extração contendo 100mM de Tris-HCl pH 8.0, 50mM de EDTA, 75mM de NaCl e 20µL de SDS a 20%. Após a incubação a 37°C, o DNA foi purificado pela extração com solventes orgânicos (0,5mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) seguida do tratamento com clorofórmio/álcool isoamílico (24/1). O sobrenadante final foi transferido para outro microtubo e precipitado com acetato de amônio 7M e etanol absoluto gelado e armazenado em *freezer* a -20° C por aproximadamente 10 horas. Após a centrifugação a 14000 rpm por 20 minutos, o DNA obtido foi lavado em etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuspenso em 50 uL de água ultrapura estéril. A quantidade e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas pela leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 nos comprimentos de onda de 260 e 280nm.

Modificação do DNA genômico pelo bissulfito de sódio

O bissulfito de sódio, em contato com o DNA, converte as citosinas não metiladas em uracilas, porém mantém as citosinas metiladas intactas. Assim, essa metodologia é bastante utilizada para avaliar o padrão de metilação do DNA, pois permite diferenciar alelos metilados de não metilados (Figura 2). O tratamento do DNA

com bissulfito de sódio foi realizado segundo um protocolo otimizado em nosso laboratório, de acordo com Paulin *et al.* (1998), com modificações: 1µg de DNA genômico foi desnaturado em um volume final de 18µL pela adição de 2µL de uma solução de NaOH 3M a 40°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionadas solução de uréia-bissulfito (6,24M de uréia/2M de metabissulfito de sódio) e 6µL de solução de hidroquinona a 10mM. Os tubos foram mantidos em termociclador e submetidos a 20 ciclos de 55°C durante 15 minutos, separados por um período de desnaturação a 95°C por 30 segundos. O DNA tratado foi purificado com o *kit Wizard DNA Clean-UP System* (Promega), segundo as recomendações do fornecedor. A modificação foi concluída pela adição de 5,0µL de NaOH a temperatura ambiente durante 10 minutos. A precipitação foi realizada pela adição de 75µL de acetato de amônio 5M, 350µL de etanol e 1,0µL de glicogênio (20µg/µL) (Invitrogen). O DNA modificado foi ressuspenso em 40µL de água ultrapura estéril e armazenado a -20°C para posterior amplificação pela PCR.

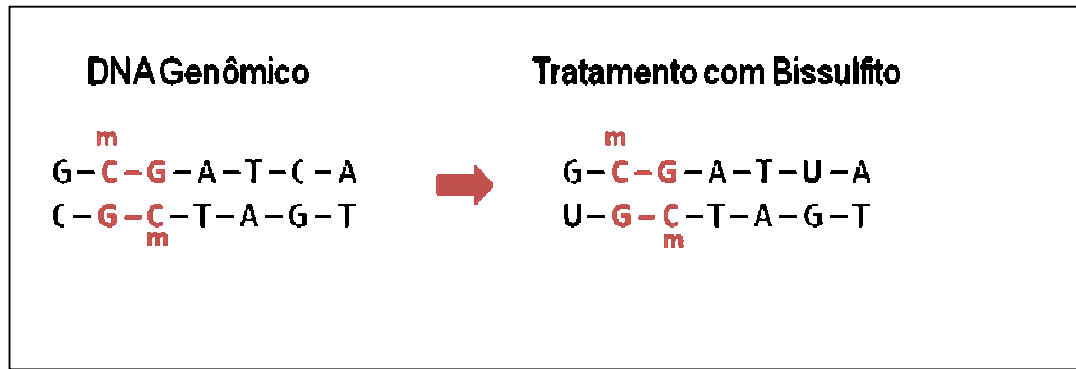


Figura 2: Ação do bissulfito de sódio no DNA genômico. O bissulfito mantém inalteradas as citosinas metiladas dos dinucleotídeos CpGs (em vermelho), porém converte citosinas não CpGs ou citosinas CpGs não metiladas em uracilas (em negrito).

Análise de metilação pela metodologia de MSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction*)

O DNA modificado foi submetido à metodologia de MSP, que necessita de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos, um para a sequência metilada e outro para a não metilada. As reações da PCR foram realizadas separadamente para cada par de oligonucleotídeos e ocorreram em um volume final de 25 µL, contendo 0,25µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 15 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 3mM de MgCl₂ e 1 U de *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems). Em cada reação foi acrescentado um controle negativo, isto é, um microtubo contendo todos os reagentes, porém sem conter DNA molde. As sequências dos oligonucleotídeos estão representadas na Tabela 1, assim como as condições de amplificação.

Os fragmentos gerados foram visualizados após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e posterior coloração com nitrato de prata. O primeiro oligonucleotídeo para a sequência metilada inclui os dinucleotídeos CpGs nas posições -66, -60 e -58 e o segundo, os dinucleotídeos das posições 77, 82, 84 e 94. A detecção de

uma banda de 170pb após a amplificação pela PCR com estes oligonucleotídeos indica que todos estes CpGs estavam metilados.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições realizadas na análise de MSP qualitativa para o gene *RASSF1A* (Burbee *et al.*, 2001).

Oligonucleotídeos iniciadores Metilado (M) e Não Metilado (U)	Condições da amplificação	
M1 5'-GGGTTTTGCGAGAGCGCG-3'	95°C por 5 min	} x 35
M2 5'- GCTAACAAACGCGAACCG-3'	95° C por 45 seg	
U1 5'-GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG-3'	55° C por 1 min	
U2 5'-CACTAACAAACACAAACCAAAC-3'	72° C por 45 seg	
	72° C por 5 min	

Otimização da técnica de qMSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction* quantitativa em tempo real)

As amostras de DNA modificadas pelo bissulfito de sódio foram utilizadas na qMSP (*quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). A PCR quantitativa em tempo real é baseada no monitoramento óptico contínuo do progresso de uma PCR fluorogênica. Foi utilizado o sistema de detecção de ácidos nucléicos *StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems)* e o corante *SYBR green* que possui ligação altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da reação (Figura 3) (Di Gioia *et al.*, 2006). Diferentemente do sistema TaqMan, que necessita de sondas marcadas, o sistema *SYBR green* detecta todo DNA dupla-fita, inclusive produtos de reação não específicos. Assim, uma reação bem otimizada é essencial para resultados precisos. Ao longo da PCR, a enzima DNA polimerase amplifica a sequência alvo, gerando os produtos da

reação, ou seja, os *amplicons*. Dessa forma, o corante se liga a cada nova cópia de DNA dupla-fita. Conforme a PCR progride, mais *amplicons* são criados. Como o *SYBR green* se liga a todo o DNA dupla-fita, o resultado é um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR. As principais vantagens desse sistema é que o mesmo pode ser utilizado para monitorar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita e que não é necessário o uso de sondas, o que reduz a configuração do ensaio e os custos de execução. Por outro lado, a desvantagem é a possibilidade de gerar sinais falso-positivos, ou seja, o corante pode se ligar a sequências não específicas de DNA dupla-fita, uma vez que a molécula de *SYBR green* se liga a qualquer DNA dupla-fita.

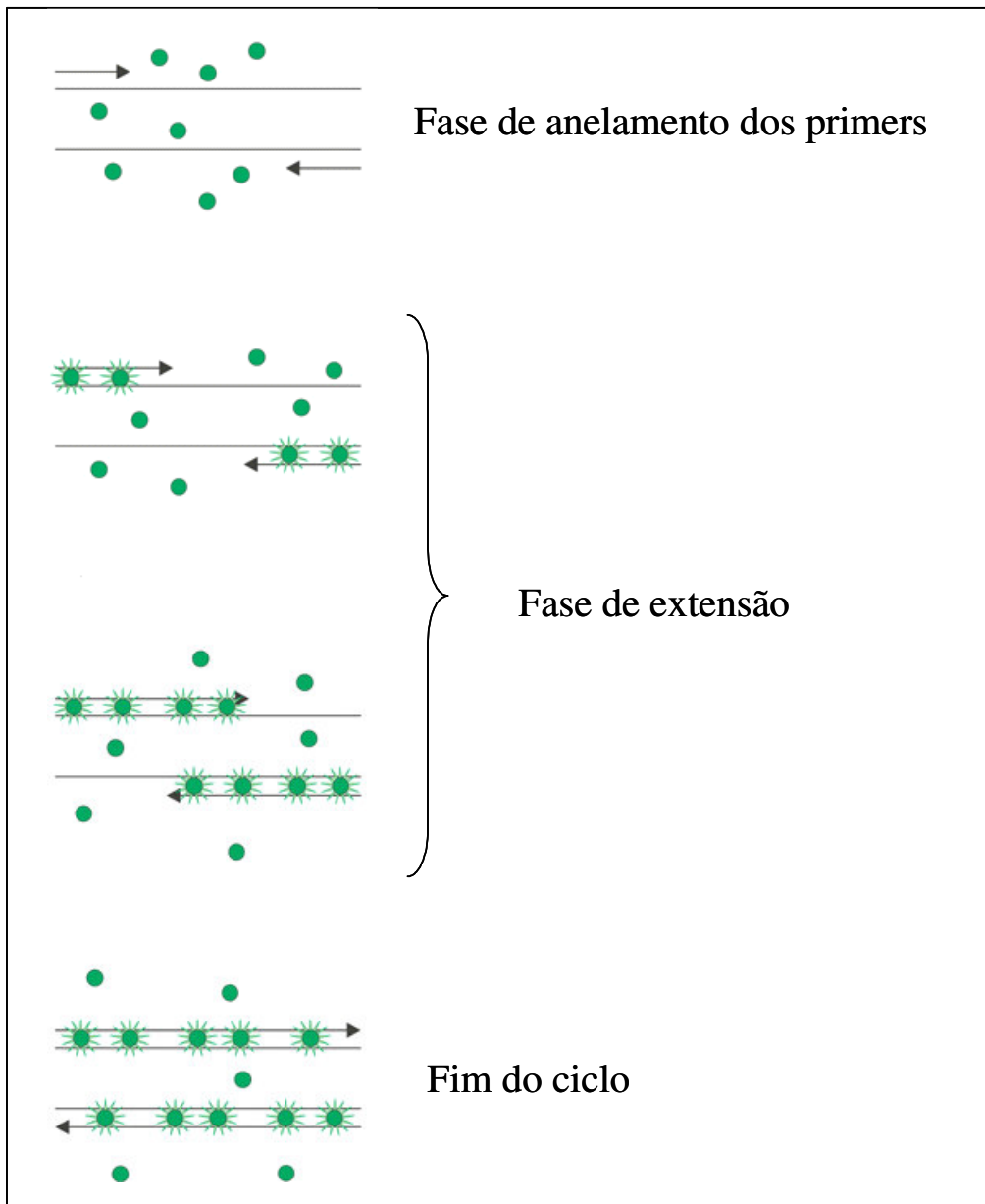


Figura 3: Modelo esquemático do sistema *SYBR green*. O corante está representado pelos círculos verdes. O *SYBR green* reconhece DNAs fita-dupla com alta especificidade. Assim, há um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR.

Nos ciclos iniciais da PCR, há uma pequena alteração no sinal de fluorescência. Essa define o *Baseline* para o gráfico de amplificação. Assim, um aumento na fluorescência acima do *Baseline* indica a detecção de alvo acumulado. Um *threshold* de fluorescência fixa pode ser ajustado acima do *Baseline*. O parâmetro CT (*threshold cycle*) é definido como o ciclo no qual a fluorescência ultrapassa o *threshold*. Dessa forma, cada amostra apresenta um valor de CT específico.

O ensaio de quantificação relativa é utilizado para analisar alterações nas quantidades de ácidos nucléicos amplificados em uma determinada amostra relativa à outra amostra de referência (controle ou calibrador). A quantificação relativa pode ser realizada através de dois métodos: método da curva padrão e método CT comparativo (ou $\Delta\Delta CT$). No método da curva padrão é preciso realizar, a cada análise, uma diluição em série para que seja possível a realização da quantificação. Em relação do método CT comparativo, um experimento de validação deve ser realizado para mostrar se as eficiências das amplificações do alvo e do controle endógeno (normalizador) são aproximadamente iguais. A vantagem de utilizar esse método é que não é preciso usar uma curva padrão. Isso aumenta o rendimento e diminui os custos, já que não é necessária a utilização de mais poços e reagentes para as amostras da curva padrão. Isso também elimina a possibilidade de qualquer erro de diluição das amostras durante a montagem da curva padrão. O resultado final é obtido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As reações foram realizadas num volume final de 10 μ L em triplicatas utilizando 200nM para os *primers* N (normalizador) e M (DNA metilado) e 60nM para os *primers* U (DNA não metilado) e 8ng de DNA modificado. Para esta análise, o padrão de metilação da região alvo foi normalizado em relação à quantidade de DNA de uma região de referência que não apresenta dinucleotídeos CpG (o próprio gene *RASSF1*).

Adicionalmente, os dados foram quantificados em relação a amostras de referências constantes:

- A) Controle hipermetilado: para a quantificação relativa dos alelos metilados foi utilizado o DNA hipermetilado obtido pelo tratamento com a enzima *SssI* (*New England Biolab*), uma CpG metilase que atua nos resíduos de citosina para induzir a hipermetilação no DNA. Dez µg de DNA genômico foram incubados com 10U da metilase *SssI* em tampão contendo 50mM de NaCl, 10mM de Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM de ditioneitol pH 7,9 durante 30 horas à 37°C, em uma reação de volume final 50µL. A S-adenosil-metionina foi utilizada como doadora de grupos metil na concentração final de 160mM. A reação foi interrompida à 65°C durante 10 minutos.
- B) Controle hipometilado: para a quantificação relativa dos alelos não metilados, foi utilizado DNA hipometilado obtido do sangue periférico de voluntários. O DNA genômico foi amplificado por dois ciclos GenomiPhi Whole DNA amplification (Amersham Biosciences), seguido da purificação com o QiAquick

O valor de Ct do normalizador foi subtraído do valor de Ct da sequencia alvo metilada da amostra calibradora (DNA controle hipermetilado com a enzima *SssI*, 100% hipermetilado). Para cada linhagem, este valor foi então subtraído do valor resultante da subtração do Ct da sequencia metilada menos o Ct da sequencia normalizadora. Este valor de $\Delta\Delta Ct$, foi então utilizado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este valor pode ser multiplicado por 100 para dar a porcentagem relativa aos 100% do controle metilado.

Os oligonucleotídeos iniciadores, incluindo o *primer* para a região normalizadora, foram selecionados seguindo o trabalho de Di Gioia e colaboradores, que também realizaram a técnica de qMSP para análise do padrão de metilação do gene *RASSF1* utilizando o sistema de *SYBR green*. Os tamanhos esperados de *amplicons* foram os seguintes: normalizador: 200pb; sequência metilada: 111pb; sequência não metilada: 147pb. Segue abaixo a tabela com os oligonucleotídeos utilizados e as condições de amplificação (Tabela 2).

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de qMSP, seguido das condições da amplificação (Di Gioia *et al*, 2006).

	Oligonucleotídeos	Condições da amplificação
Metilado	CGGTTTTTTTTAGTTTTTTTCGTCG TAACTTTAAACGCTAACAAACGCGAA	95° C por 10 min 95° C por 15 seg } 60° C por 1 min } 40x
Não Metilado	TGTGTGGTTTTTTTTAGTTTTTTTGTG CCCAACATAACCCAATTAACCCA	
Normalizador	GGGTTTATAGTTTTTGTATTTAGGTT AACTCAATAAACTCAAACCTCCC	

RESULTADOS

Tratamento celular

Foram realizados diferentes tratamentos nas linhagens celulares MCF7 e MDA-MB-231 com a finalidade de avaliar o efeito das drogas 5-aza-2'-desoxicitidina (Aza) e tricostatina A (TSA) nas taxas de proliferação celular e escolher o mais apropriado para a análise do padrão de metilação do gene *RASSF1* após tais tratamentos. Devido à toxicidade vista em doses elevadas das duas drogas e seguindo a principal forma de tratamento preconizada pela literatura, o protocolo escolhido abrangeu o tratamento contínuo com 1 μ M de Aza por 96 horas, seguido ou não de 300ng/mL de TSA por 24 horas. Em cada ensaio, foi realizado um controle não tratado (Gráficos 1, 2 e 3).

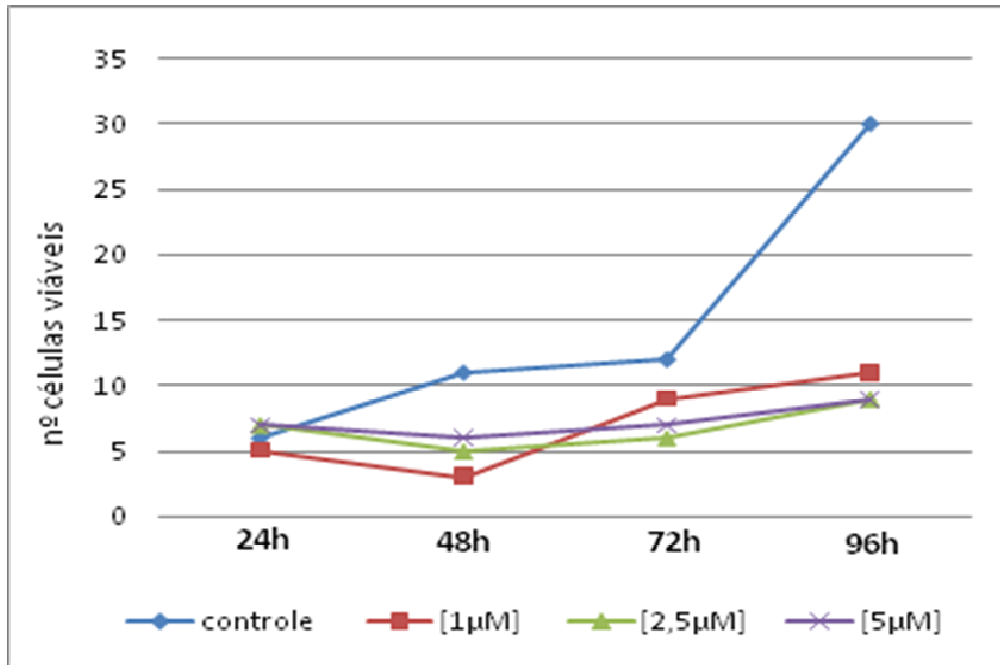


Gráfico 1: Contagem de células viáveis após tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina em três concentrações diferentes (1µM; 2,5µM e 5µM) e em quatro períodos diferentes (24h; 48h; 72h e 96h). Apesar de não haver diferenças estatisticamente diferente entre as concentrações testadas, nota-se que a concentração de 1µM foi a que menos inibiu a proliferação celular após 96 horas de tratamento.

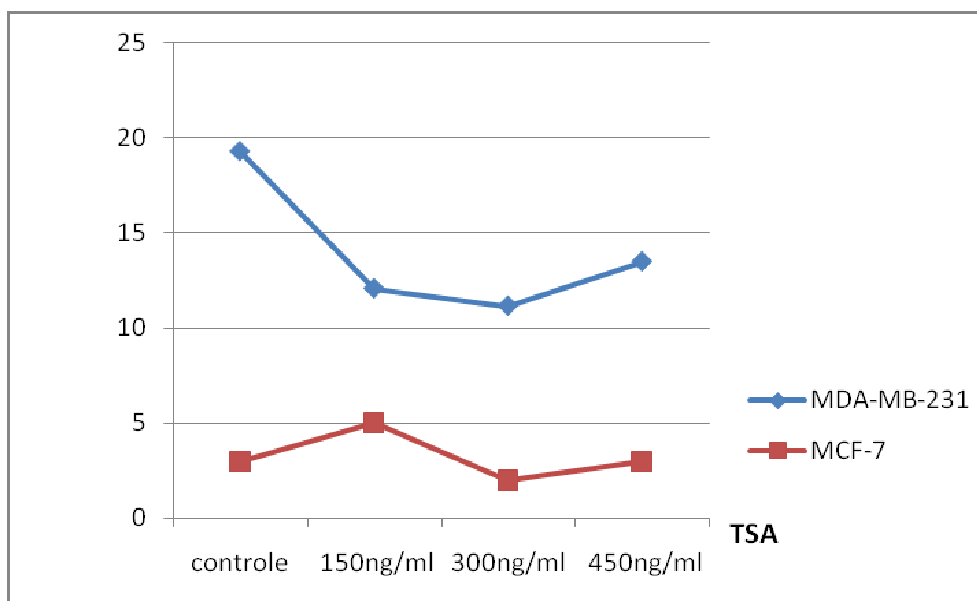


Gráfico 2: Contagem de células viáveis após tratamento com tricostatina A em três concentrações diferentes (150ng/mL; 300ng/mL e 450ng/mL) por um período de 24h. A linhagem MDA-MB-231 sofreu um menor efeito inibitório nas taxas de proliferação celular do que a linhagem MCF-7.

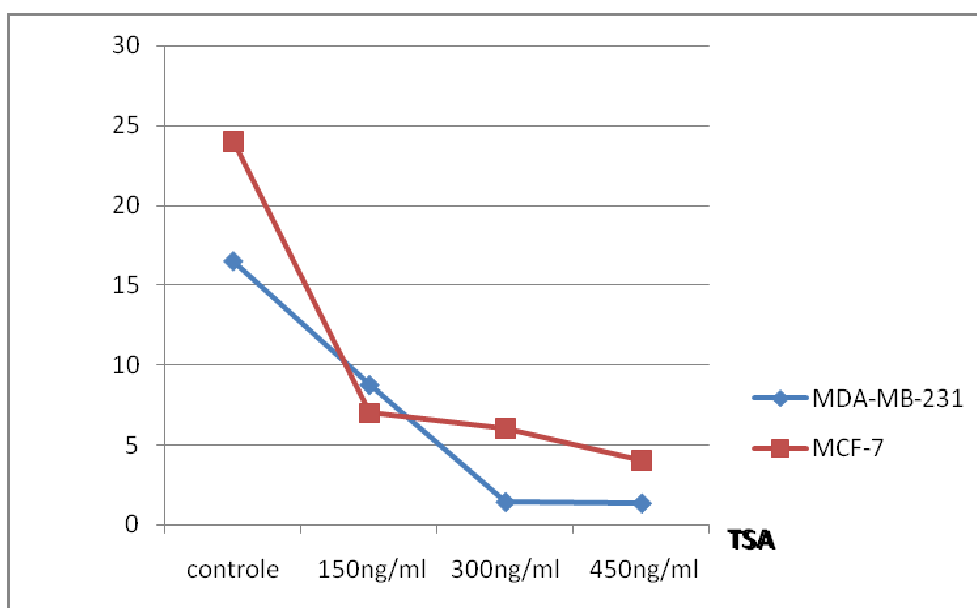


Gráfico 3: Contagem de células viáveis após tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina por um período de 96h seguido do tratamento com tricostatina em três concentrações diferentes (150ng/mL; 300ng/mL e 450ng/mL).

Análise de metilação pela técnica de MSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction*)

Após a modificação com bissulfito de sódio, o DNA foi submetido à técnica de MSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction*) que precisa de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, um para a sequência metilada e outro para a sequência não metilada. Assim, cada reação foi realizada separadamente, ou seja, *singleplex*. O ensaio foi interpretado após a eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e coloração com nitrato de prata.

A Figura 4 apresenta o padrão de metilação detectado nas linhagens celulares MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-134 e SKBR3 após realização da técnica de MSP. É possível detectar apenas a presença de alelos metilados nas quatro linhagens, demonstrando a hipermetilação da região promotora da isoforma *RASSF1A* do gene *RASSF1* nessas amostras de DNAs.

A Figura 5 demonstra o padrão de metilação visto nas linhagens MCF7 e MDA-MB-231 após o tratamento com o agente desmetilante Aza e o inibidor de desacetilases de histonas TSA isoladamente e após o tratamento conjunto dessas duas drogas.

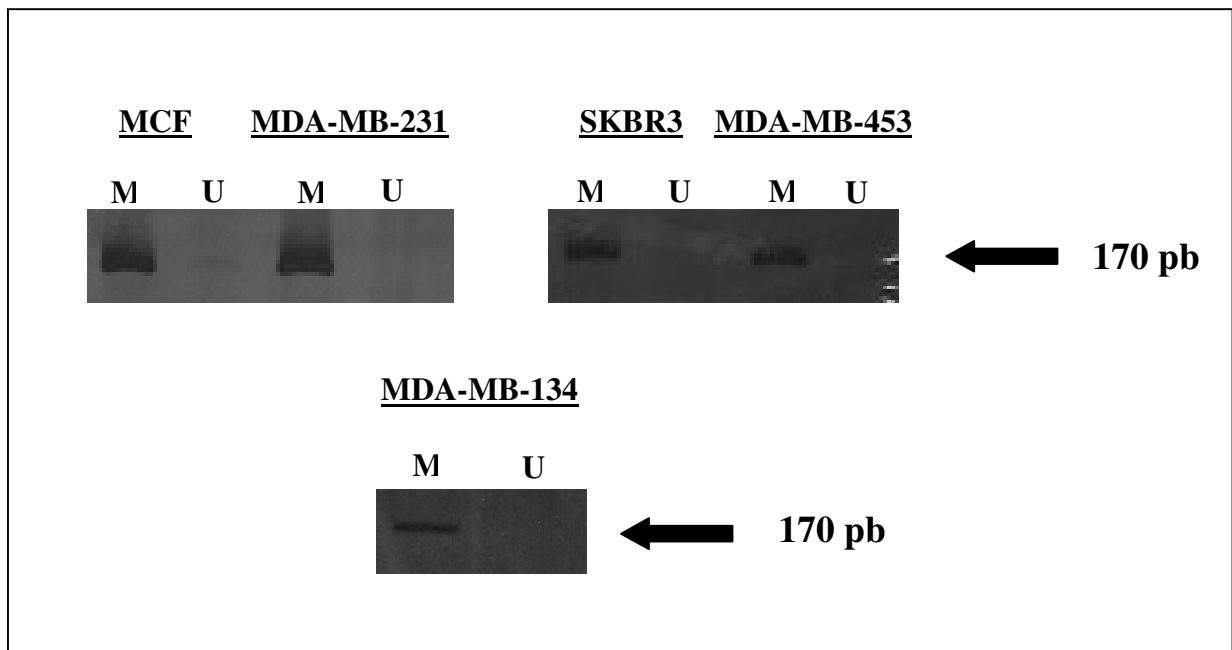


Figura 4: Padrão de metilação detectado nas linhagens MCF7, MDA-MB-231, SKBR3, MDA-MB-453 e MDA-MB-134 após a técnica de MSP. M: DNA metilado; U: DNA não metilado.

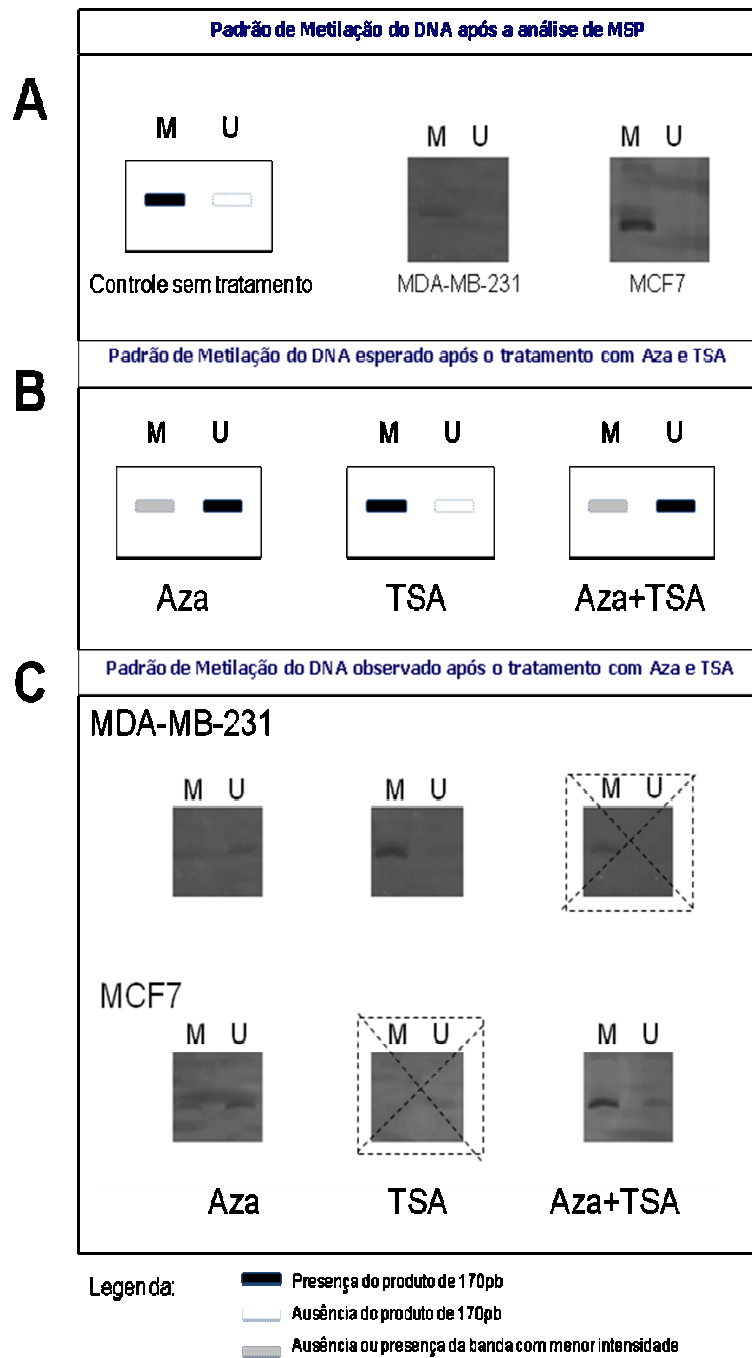


Figura 5: A) Padrão de metilação das linhagens MDA-MB-231 e MCF7. B) Padrão de metilação esperado após os tratamentos com Aza, TSA e Aza + TSA, respectivamente, para as linhagens que mostram unicamente alelos metilados. C) Resultados observados após tratamentos das linhagens MDA-MB-231 e MCF7 com Aza, TSA e Aza + TSA, respectivamente. Resultados discordantes do esperado estão destacados pela linha pontilhada. M: presença de DNA metilado; U: detecção de DNA não metilado.

Otimização da técnica de qMSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction quantitativa em tempo real*)

Para otimização da técnica de qMSP (*Methylation-specific polymerase chain reaction*), foi preparada uma amostra de DNA controle hipermetilado (usando a enzima *SssI* - *New England Biolab*) (Figura 6) para utilizar como controle das reações. Para a avaliação do sucesso de obtenção deste controle, esta amostra foi submetida à análise de MSP convencional que, conforme o esperado, confirmou a amplificação exclusiva de DNA hipermetilado (reação M).

O primeiro ensaio de PCR em tempo real foi realizado para analisar a concentração ideal para os três pares de oligonucleotídeos iniciadores e abrangeu as concentrações de 100nM, 200nM e 400nM para cada par de oligonucleotídeo. Após a visualização do *amplification plot* (Figura 8), os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese para a comparação dos resultados e confirmação da especificidade de amplificação (Figura 9). A concentração que se mostrou apropriada para os *primers* N e M foi a de 200nM. Para o *primer* U, que apresentou presença elevada de dímeros de *primers*, foi preciso realizar um novo teste com concentrações menores, sendo que a concentração que demonstrou menor quantidade desses dímeros foi a de 60nM.

Em seguida, foi realizada a curva de eficiência para os três pares de *primers* para que o ensaio de qMSP pudesse atingir o padrão de qualidade esperado (Figuras 9, 10, 11, 12, 13, 14). A eficiência esperada deve ser de 100% ou valores próximos permitindo uma diferença de 10% acima ou abaixo desse valor. Para tal análise é preciso preparar diversas diluições contando com diferentes concentrações do DNA molde inicial. Foram construídas curvas de diluição para cada conjunto de *primers* que foram utilizados

segundo as seguintes concentrações: pares N e M 200nM e par U 60nM, como resultado do ensaio anterior. As cinco diluições foram realizadas na proporção de 1:5 e a concentração inicial de DNA foi de 15ng.

Como as três eficiências foram aceitáveis, foi possível realizar o último ensaio para posterior análise da metilação nas cinco linhagens. As figuras 15, 16 e 17 são referentes às linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3 e as figuras 18, 19 e 20 são referentes às linhagens MDA-MB-134 e MDA-MB-453. Neste ensaio, utilizamos uma abordagem de quantificação relativa (adaptado de Kristensen *et al*, 2008).

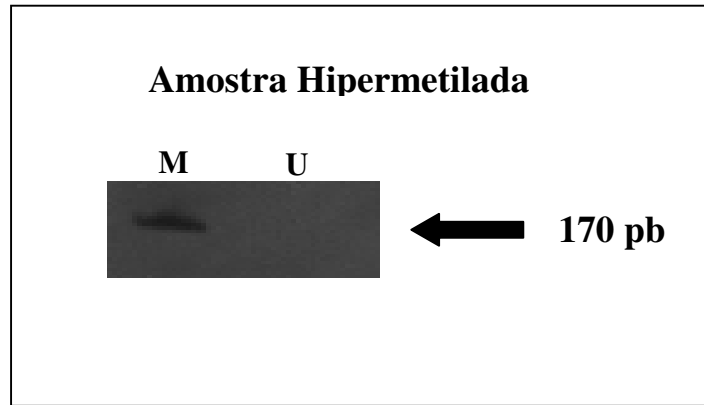


Figura 6: Amostra controle hipermetilada preparada com a utilização da metilase *SssI*, confirmando a amplificação exclusiva da banda de 170pb obtida com o conjunto de *primers* para a sequência metilada. M: sequência metilada; U: sequência não metilada; 170pb: tamanho do amplicon.

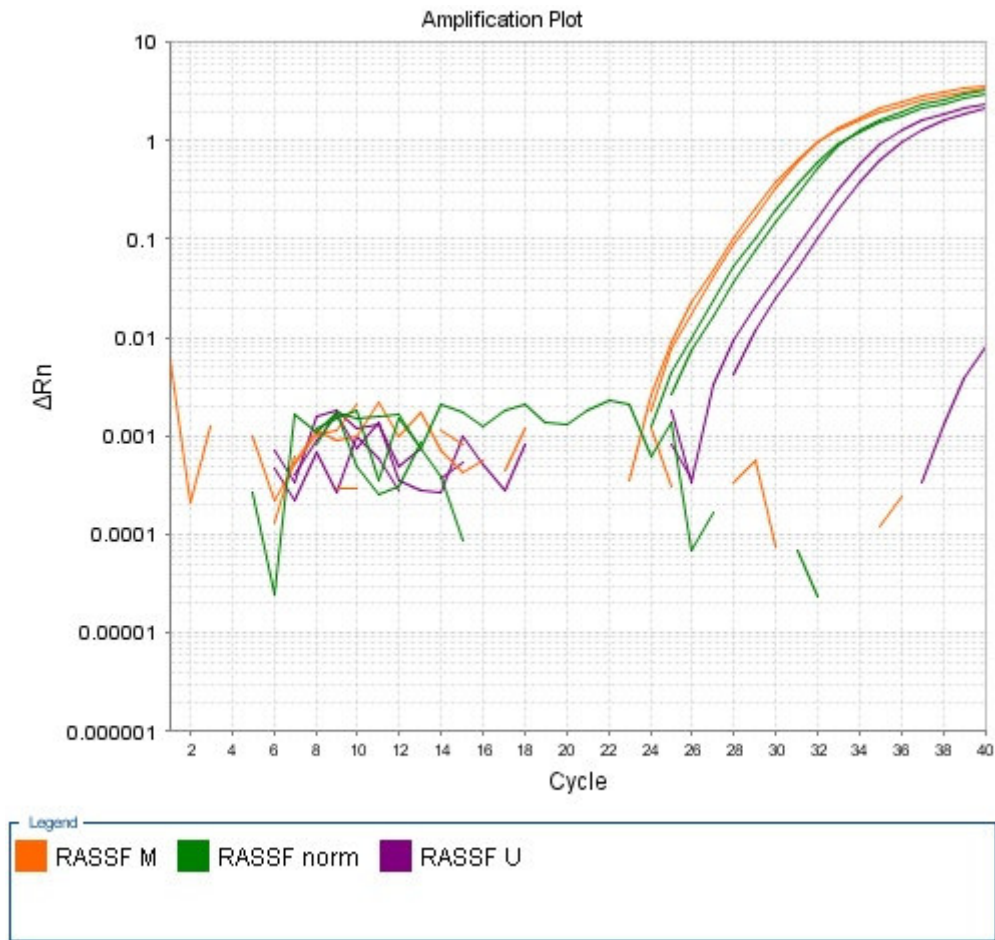


Figura 7: Curva de amplificação mostrando os três pares de oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 200nM. RASSF M: oligonucleotídeo para seqüência metilada; RASSF norm: oligonucleotídeo normalizador; RASSF U: oligonucleotídeo para seqüência não metilada.

MCF7 - Duplicatas

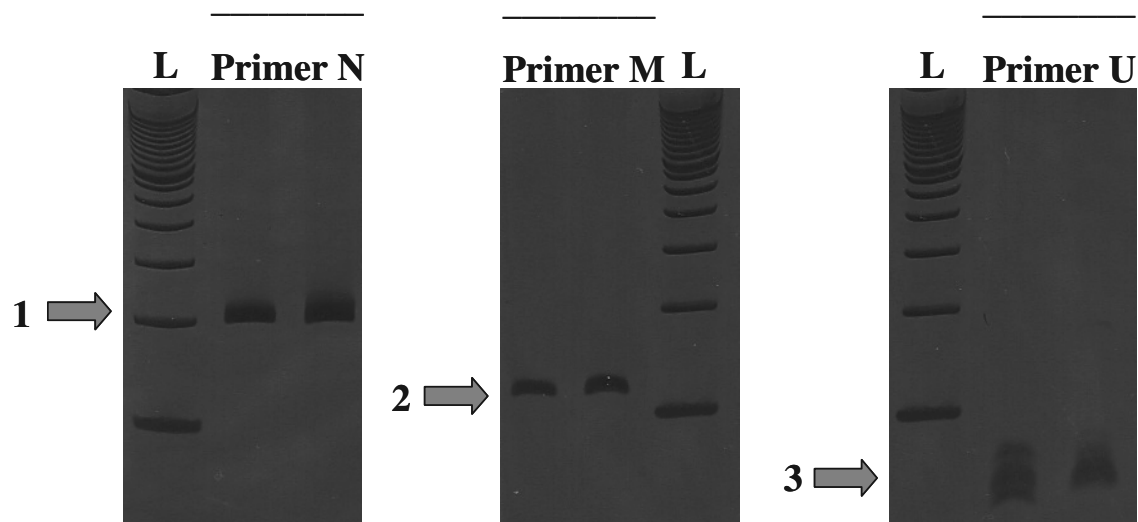


Figura 8: Verificação do resultado visualizado na técnica de qMSP mostrando as duplicatas com os três pares de primers utilizados no ensaio na concentração de 200nM. **MCF7:** linhagem usada no ensaio; **Primer N:** oligonucleotídeos para a amplificação do sequencia normalizadora; **Primer M:** oligonucleotídeos para sequência metilada; **Primer U:** oligonucleotídeos para sequência não metilada; **L:** marcador de DNA; **1:** *amplicon* com tamanho de 200pb; **2:** *amplicon* com tamanho de 111pb; **3:** presença de dímeros de *primers*.

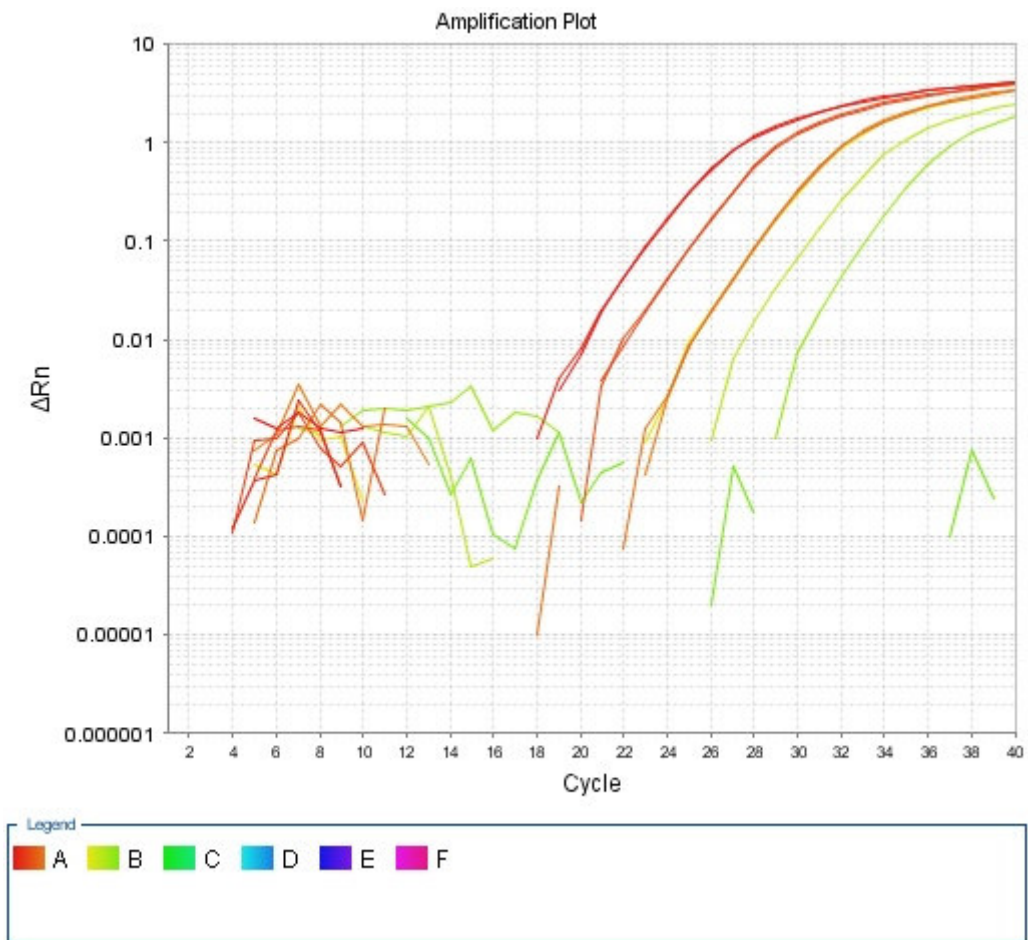


Figura 9: Curva de amplificação da eficiência do *primer* normalizador.

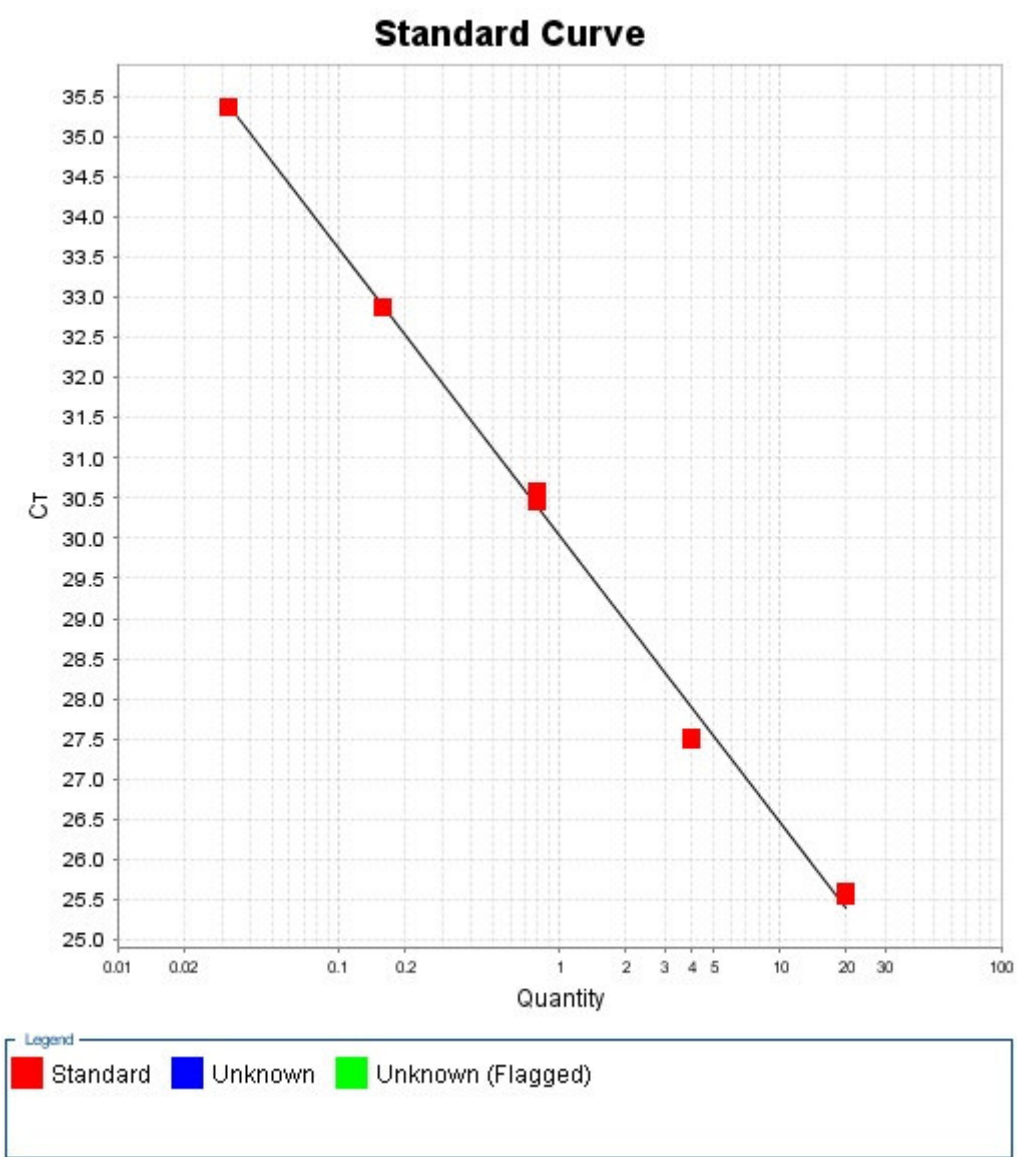


Figura 10: Curva padrão referente à curva de eficiência do *primer* normalizador.

Parâmetros: *slope*: -3,57, R^2 : 0,99, eficiência: 90,4%.

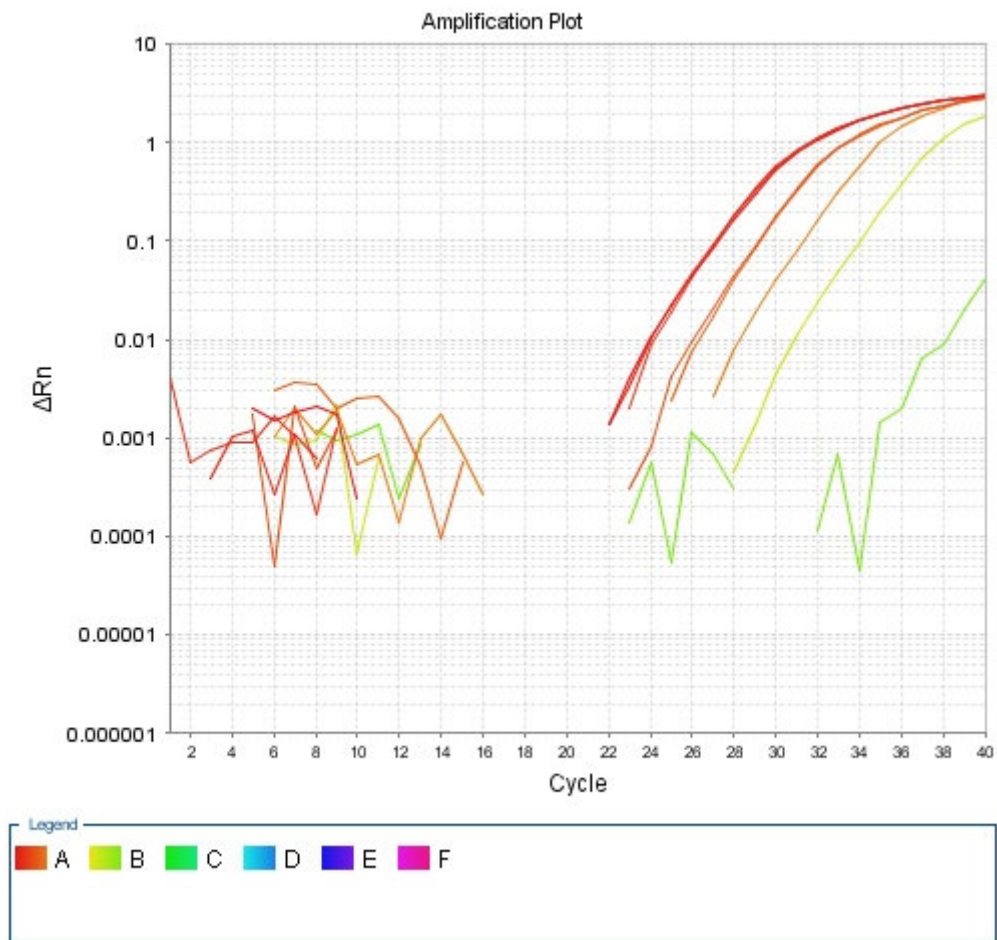


Figura 11: Curva de amplificação da eficiência do *primer* M, ou seja, para sequência metilada.

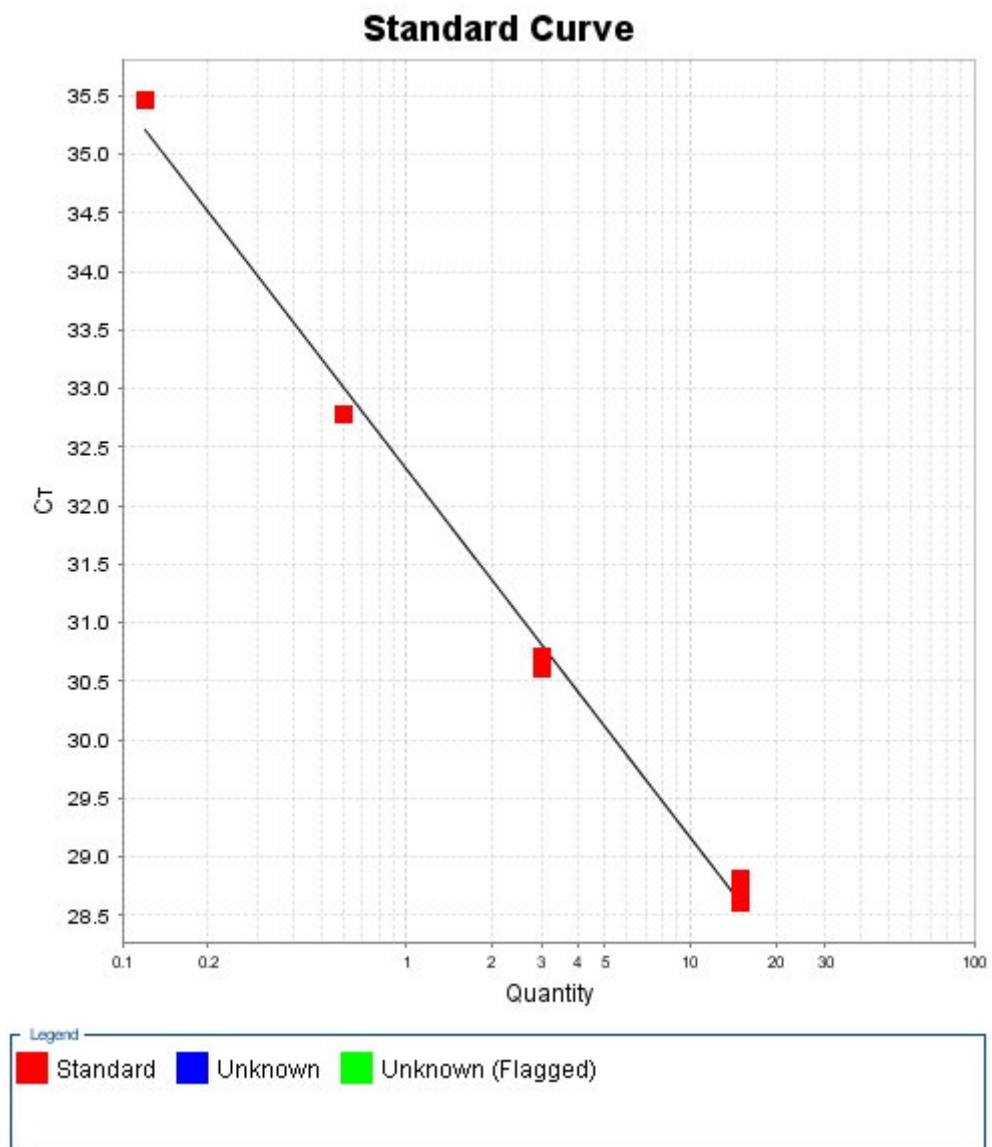


Figura 12: Curva padrão referente à curva de eficiência do *primer M*.

Parâmetros: *slope*: -3,15, R^2 : 0,99, eficiência: 107,7%.

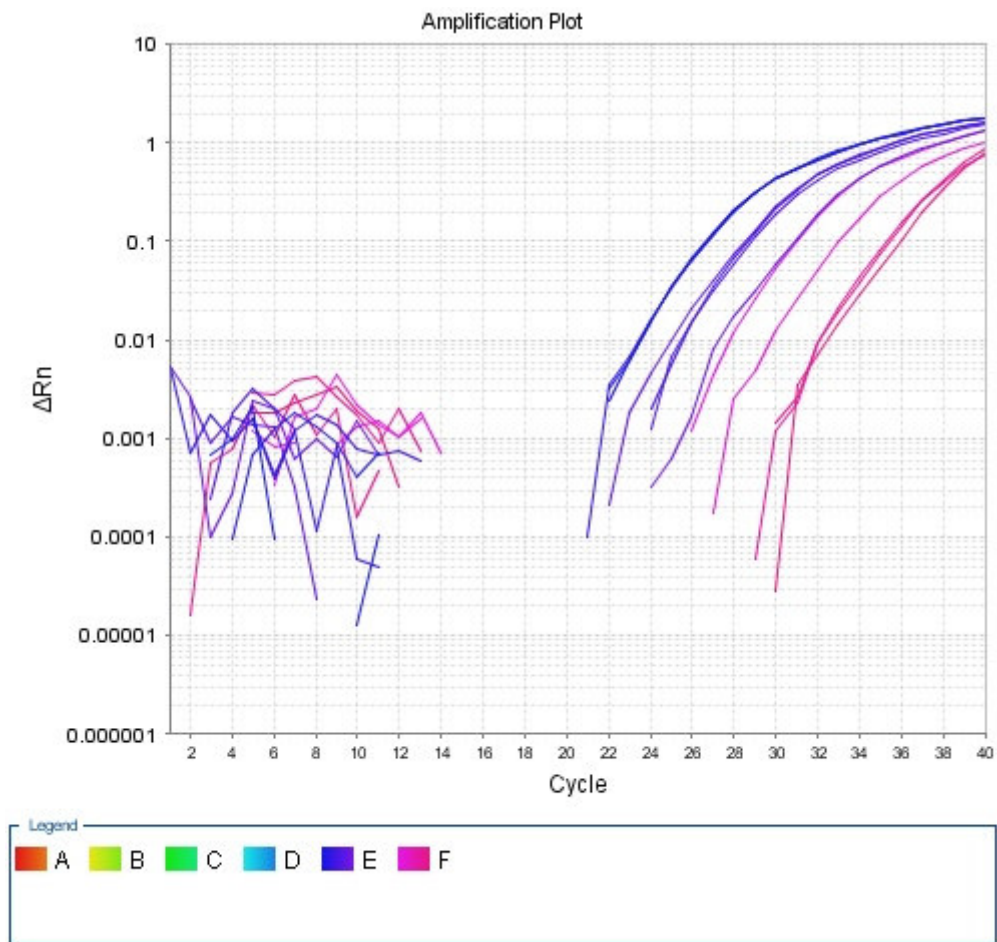


Figura 13: Curva de amplificação da eficiência do *primer* U, ou seja, para sequências não metiladas.

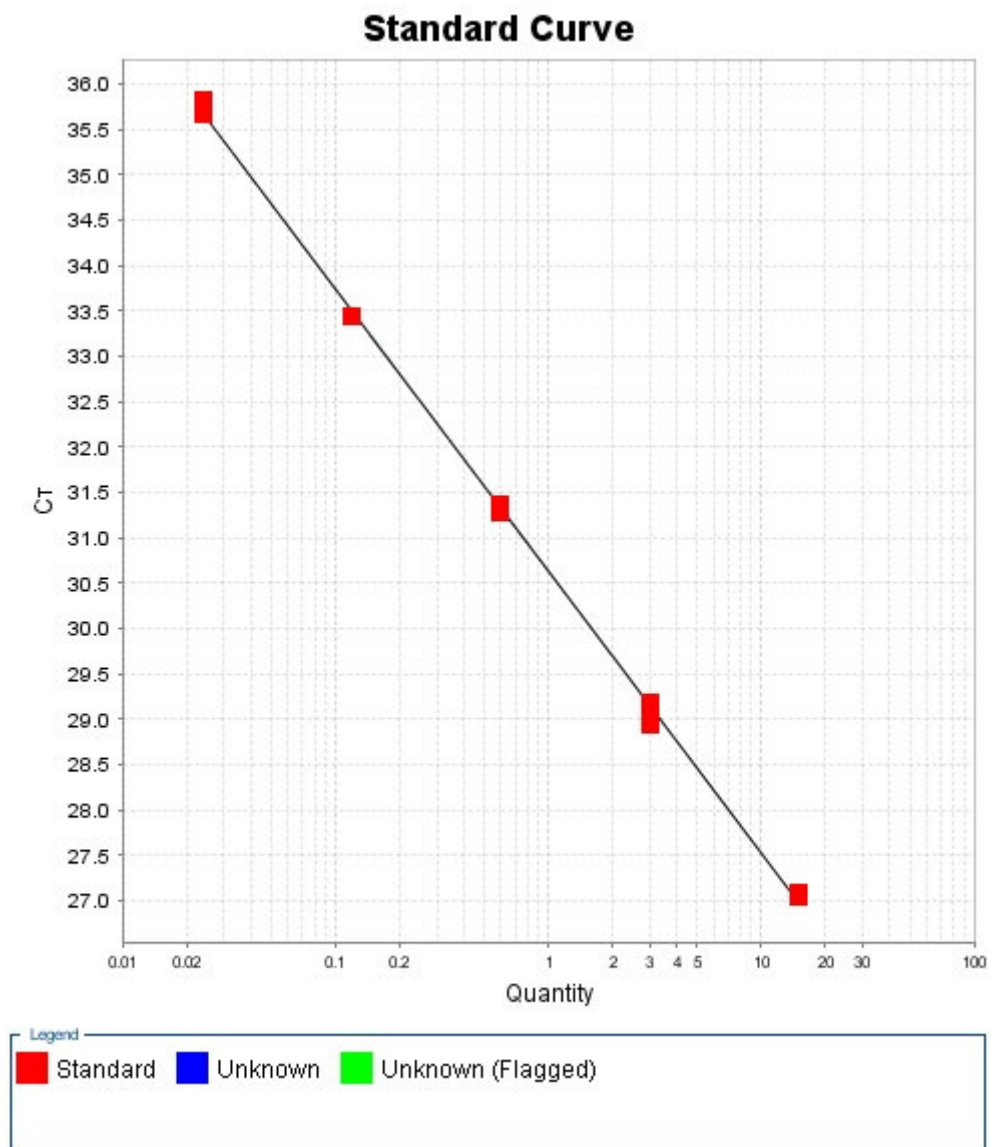


Figura 14: Curva padrão referente à curva de eficiência do *primer U*.

Parâmetros: *slope*: -3,11, R^2 : 0,99, 109,4%.

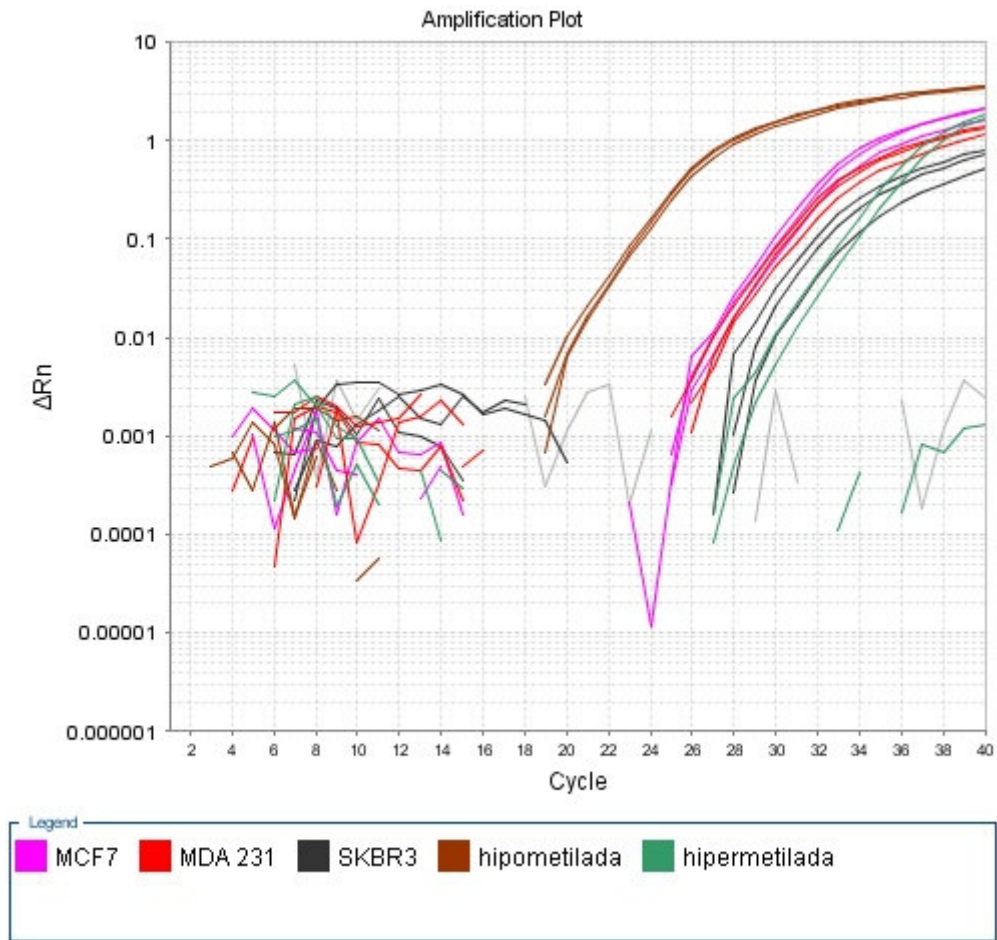


Figura 15: Curva de amplificação para o *primer* N (normalizador) utilizando amostras hipometilada, hipermetilada e as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3.

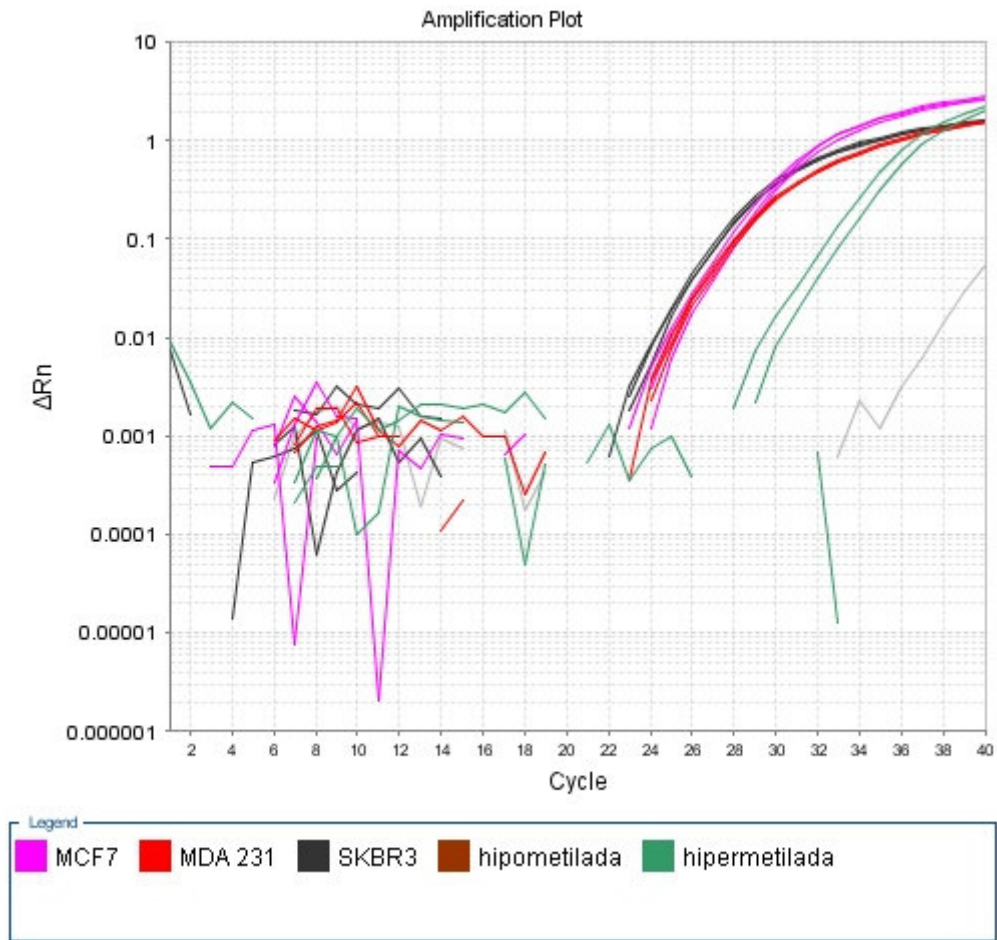


Figura 16: Curva de amplificação para o *primer* M (sequência metilada) utilizando amostras hipometilada, hipermetilada e as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3.

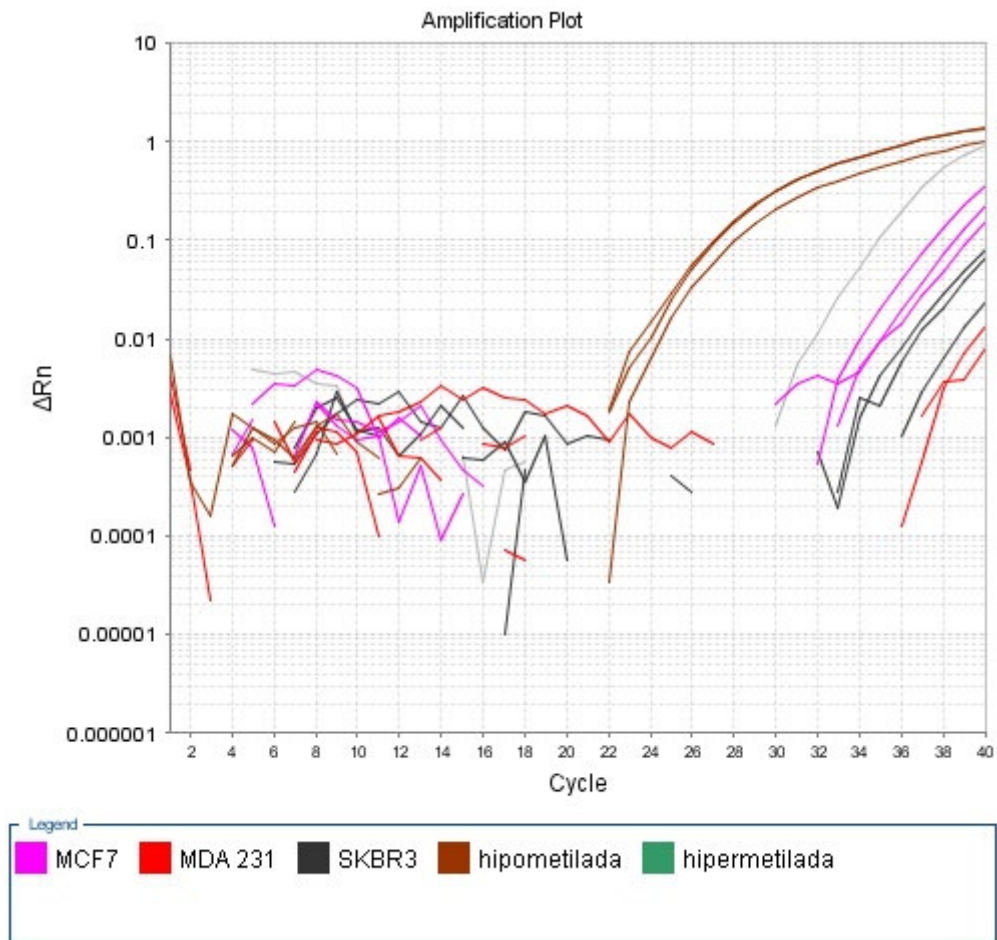


Figura 17: Curva de amplificação para o *primer* U (sequência não metilada) utilizando amostras hipometilada, hipermetilada e as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3.

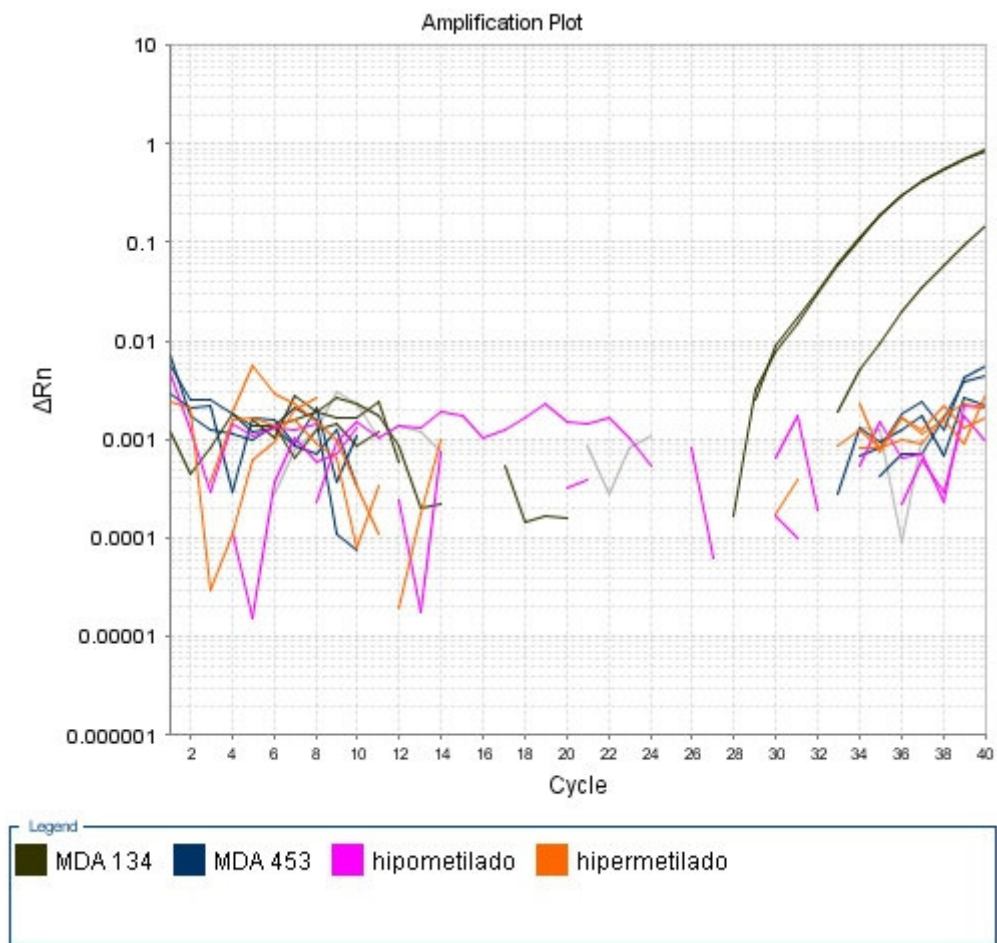


Figura 18: Curva de amplificação para o *primer* N (normalizador) utilizando amostras hipometilada (referente a sangue periférico), hipermetilada e as linhagens MDA-MB-134 e MDA-MB-453.

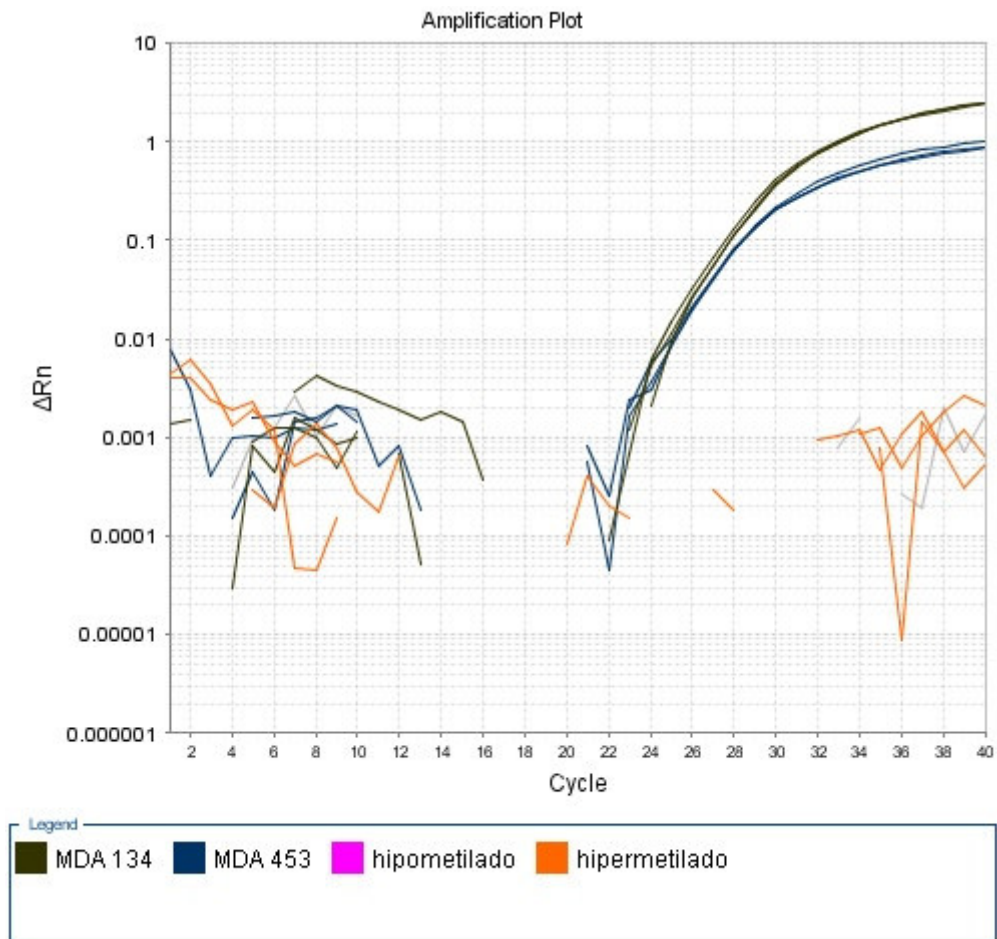


Figura 19: Curva de amplificação para o *primer* M (sequência metilada) utilizando amostras hipometilada (referente a sangue periférico), hipermetilada e as linhagens MDA-MB-134 e MDA-MB-453.

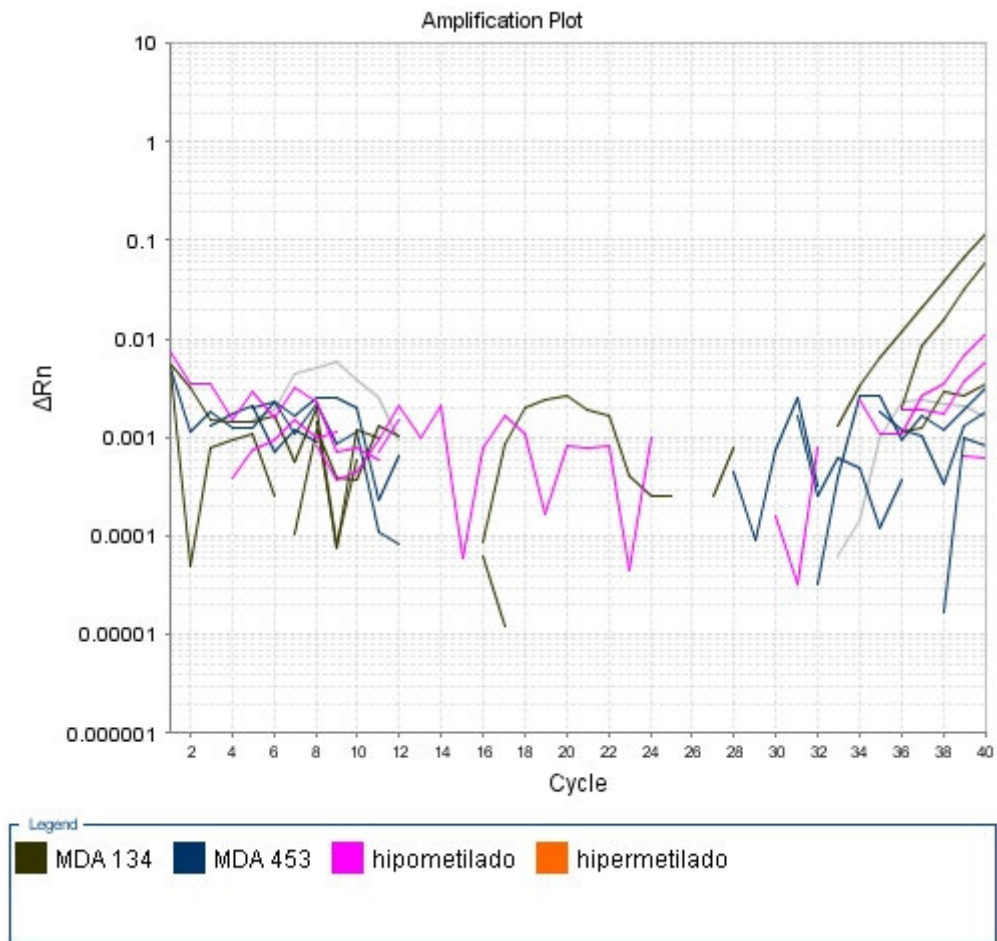


Figura 20: Curva de amplificação para o primer U (sequência não metilada) utilizando amostras hipometilada, hipermetilada e as linhagens MDA-MB-134 e MDA-MB-453.

Considerando-se a ausência de amplificação de alelos não metilados nas cinco linhagens pela análise de MSP qualitativa e os baixos níveis de amplificação destes na qMSP, não foi possível realizar o cálculo da quantificação relativas para estes alelos. Os dados da quantificação relativa da metilação nas linhagens estão detalhados na tabela 3. No conjunto, estes dados confirmaram que as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3 apresentam apenas alelos metilados .

Tabela 3: Valores referentes ao cálculo da quantificação relativa da metilação do gene *RASSF1A*.

Amostras	CT médio (N)	CT médio (M)	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
Hipermetilada	33,72	33,5	-0,22		1,0
MCF7	30,37	28,6	-1,77	-1,55	3,38
MDA-MB-231	30,75	28,6	-1,98	-1,76	2,93
MDA-MB-134	*	*	*	*	*
MDA-MB-453	*	*	*	*	*
SKBR3	32,74	27,91	-4,83	-4,61	24,42

* Linhagens que apresentaram falha na amplificação. O valor de Ct do normalizador foi subtraído do valor de Ct da sequencia alvo metilada da amostra calibradora (DNA controle hipermetilado com a enzima *SssI*, 100% hipermetilado). Para cada linhagem, este valor foi então subtraído do valor resultante da subtração do Ct da sequencia metilada menos o Ct da sequencia normalizadora ($\Delta\Delta$ Ct).

DISCUSSÃO

Evidências recentes sugerem que os mecanismos epigenéticos possuem papel importante na carcinogênese, contribuindo com a instabilidade genética no câncer de mama, assim como no silenciamento de genes específicos. Diversos genes foram descritos como sendo inativados em câncer de mama através do silenciamento dependente da metilação, o que inclui genes de controle do ciclo celular (*TP16^{INK4a}*), genes de receptores hormonais (*ESR1*), genes supressores tumorais (*RASSF1*), genes associados a metástase (*CDH1*), entre outros (Rivenbark *et al*, 2006).

De todos os genes presentes na região crítica de 3p21.3, o *RASSF1* é, sem dúvida, um dos mais estudados recentemente tanto em estudos genéticos, como também epigenéticos e em níveis funcionais. O gene *RASSF1* gera sete transcritos diferentes, denominados *RASSFIA-G*, devido a vias de *splicing* alternativos e uso diferencial do promotor. A isoforma *RASSFIA* é o principal alvo das pesquisas principalmente pela ausência da sua expressão em diversos tipos de cânceres. A principal causa da perda de expressão em muitos tumores é devida à hipermetilação da região promotora desse gene (Hesson *et al*, 2007).

O silenciamento gênico pela metilação do DNA é um fenômeno que comumente ocorre em células cancerosas humanas. Tem sido relatado que a metilação do promotor exerce papel essencial na perda de função de certos genes supressores tumorais. A perda da expressão do *RASSFIA* é um dos eventos mais comuns presentes em cânceres humanos, com metilação aberrante no promotor relatado em, pelo menos, 37 tipos diferentes de neoplasias, incluindo o câncer de mama. De fato, a hipermetilação do promotor desse gene já foi demonstrada na hiperplasia epitelial e em papilomas

intraductais em mama, assim como em epitélio canceroso, sugerindo que a metilação do *RASSF1A* é um evento precoce na carcinogênese (Van Der Weyden *et al*, 2008).

O uso de linhagens celulares no estudo das neoplasias é um modelo amplamente utilizado por diversos grupos de pesquisas que permite inferências importantes acerca dos mais diversos mecanismos presentes nas células tumorais (Lerescu *et al*, 2008; Mendez *et al*, 2009; Van Staveren *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2009; Piantino *et al*, 2009). Além disso, muitos grupos também usam amostras de tumores, em paralelo ou não com o uso de linhagens, o que, sem dúvida, ajuda a esclarecer a relação com o prognóstico e a taxa de sobrevivência dos pacientes (Yan *et al*, 2003, Yazici *et al*, 2009; Kioulafa *et al*, 2009; Karray-Chouayekh *et al*, 2009). Estudos anteriores do nosso grupo, demonstraram altas frequências da hipermetilação do DNA em genes específicos em carcinomas mamários (*CDH1*) e de amostras de câncer de bexiga (genes *SFN*, *CDH1*, *RARB* e *RASSF1A*) (Caldeira *et al*, 2006; Negraes *et al*, 2008).

Com a intenção de compreender melhor o mecanismo dos genes sensíveis à metilação, muitos estudos têm empregado o tratamento de culturas celulares com drogas desmetilantes e/ou inibidores de desacetilases de histonas (Pryzbylkowski *et al*, 2007; Hostetter *et al*, 2008). O agente Aza (5-aza-2'-desoxicitidina) é um inibidor das DNA metiltransferases que causa desmetilação do DNA e re-expressão de genes silenciados pela hipermetilação das ilhas CpGs presentes em regiões promotoras (Numoto *et al*, 2009). Já o agente TSA (tricostatina A) é um inibidor das desacetilases de histonas que estabiliza o estado de acetilação das histonas com elevado grau de eficiência (Taddei *et al*, 2005).

O nosso experimento com tratamentos em diferentes concentrações de Aza mostrou certa toxicidade em relação às culturas que não receberam tratamento (Gráfico 1), concordando com dados presentes na literatura que afirmam que a Aza é um agente

tóxico quando utilizado em altas concentrações. O resultado obtido somente com tratamento de TSA em três concentrações diferentes (150, 300 e 450 ng/mL) demonstrou uma discrepância pronunciada entre as duas linhagens utilizadas no ensaio: MCF7 e MDA-MB-231 (Gráfico 2). Apesar das duas linhagens terem apresentado queda no número de células viáveis na concentração de 300ng/mL, não houve queda significativa de células viáveis na concentração de 450ng/mL. Além disso, a linhagem MDA-MB-231 apresentou sempre maior número de células viáveis em relação à linhagem MCF7. O Gráfico 3 foi o que apresentou maior concordância com o esperado. Houve um declínio contínuo de células viáveis conforme o aumento da concentração de TSA tanto na linhagem MCF7 quanto na linhagem MDA-MB-231, concordando com dados da literatura que também mostram citotoxicidade em doses elevadas de TSA.

A técnica de MSP convencional demonstrou um padrão hipermetilado da região promotora do gene *RASSF1A* em todas as linhagens analisadas no estudo: MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-134 e SKBR3. Tal resultado era esperado e corrobora com muitos autores que relacionam a hipermetilação da isoforma *RASSF1A* do gene *RASSF1* com o processo de carcinogênese, uma vez que esse gene está inativo em diversas formas de carcinomas, incluindo o carcinoma mamário (Van Der Weyden *et al*, 2008).

Nossos dados obtidos com a técnica de MSP após o tratamento com o agente desmetilante Aza e o inibidor de desacetilase de histonas TSA também foram, em grande parte, concordantes com os dados presentes na literatura. Rivenbark *et al*. também demonstraram a re-expressão de genes após tratamento da linhagem MCF7 com a droga Aza. Assim como o esperado, nossas análises confirmaram que o gene *RASSF1A*, que se apresentava metilado nas células não tratadas, sofreu re-expressão

após o tratamento com a droga desmetilante 5-aza-2'desoxicitidina (Aza) (dados não apresentados).

Alguns dados de MSP foram discordantes ao esperado para os tratamentos aplicados, como o tratamento combinado de Aza e TSA na linhagem MDA-MB-231 e o tratamento com TSA na linhagem MCF7: o tratamento isolado com TSA não deveria apresentar desmetilação da amostra, visto que essa droga não atua diretamente na metilação do DNA, mas na inibição das desacetilases das histonas (Figura 5C, linhagem MCF7). O tratamento combinado com TSA e Aza teoricamente deve mostrar presença das bandas M e U, ou seja, presença de DNA metilado e não metilado, já que a Aza causa desmetilação do DNA o TSA não modifica diretamente o padrão de metilação (Figura 5C, linhagem MDA-MB-231).

Como esse estudo fez parte de um estudo maior que visa a caracterização epigenética de genes supressores tumorais mapeados em 3p21.3, tais resultados que não eram esperados serão posteriormente repetidos para confirmação. Apesar dessas discrepâncias, os dados apresentados confirmam que os tratamentos com as drogas foram otimizados no nosso laboratório e serão utilizados em estudos subsequentes que visam à comparação dos níveis de expressão e dos padrões de metilação em genes mapeados em 3p21.3, próximos ao *RASSF1*. Este estudo maior investiga o possível mecanismo de silenciamento epigenético de genes contíguos como possíveis novos marcadores para o câncer de mama.

No ano de 2001, Lehmann et al. fizeram os primeiros ensaios de MSP em tempo real. O grupo realizou o experimento utilizando o sistema TaqMan, que necessita de sondas marcadas que se ligam somente à sequência alvo, uma vez que elas são produzidas para se ligarem na sequência do molde presente entre o local de anelamento dos *primers*. Entretanto, já estão disponíveis diversos modos para analisar a metilação

presente no DNA usando técnicas em tempo real. Kristensen & Hansen descrevem as quatro principais técnicas utilizadas atualmente. A técnica *MethyLight* foi a mesma realizada por Lehmann et al. Em maiores detalhes, o sinal fluorescente é criado pela clivagem da sonda que hibridiza entre os *primers* através da atividade de exonuclease da DNA polimerase. Estas sondas são marcadas com um fluoróforo e uma molécula denominada *quencher*. Após a clivagem, o fluoróforo se separa do *quencher* e a luz é emitida. A luz emitida é proporcional à quantidade de *amplicon* presente na placa e, então, dímeros de *primers* não são detectados. Na metodologia chamada SMART-MSP (*Sensitive melting analysis after real-time MSP*) utilizando *SYBR green*, o uso de corantes que se intercalam entre DNA de dupla-fita permite a criação do sinal em tempo real. As moléculas do corante emitem luz somente quando ligadas ao DNA de dupla-fita, portanto, a magnitude do sinal é proporcional à quantidade de DNA de dupla-fita presente na placa. Na técnica MS-FLAG (*Methylation-specific fluorescent amplicon generation*), a clivagem de *primers* marcados por uma endonuclease termoestável (*PspGI*) permite a criação do sinal em tempo real. O sítio de reconhecimento dessa enzima é criado somente após a DNA polimerase ter realizado a extensão da região alvo. Assim como a técnica *MethyLight*, a molécula *quencher* é separada do fluoróforo e a luz emitida é proporcional à quantidade de DNA de dupla-fita dentro da placa.

A otimização da técnica de qMSP foi extremamente importante e vantajosa para o laboratório, uma vez que outros projetos também utilizarão essa técnica para análise de metilação. O sistema escolhido para a análise, o sistema *SYBR green*, é um dos sistemas normalmente utilizados na PCR em tempo real e apresenta duas características importantes: aumento da fluorescência quando ligado ao DNA dupla-fita e ausência de inibição da PCR.

O primeiro ensaio realizado em tempo real para otimizar a concentração ideal dos oligonucleotídeos iniciadores apresentou elevada sensibilidade e eficiência (Figura 7). Adicionalmente, a especificidade da amplificação detectada principalmente após a verificação do resultado em gel de poliacrilamida (Figura 8) foi uma informação relevante nesta etapa de implantação deste nova abordagem no laboratório: após este primeiro ensaio a amplificação para os *primers* normalizador (N) e de sequência metilada (M) e falta de amplificação para o *primer* de sequência não metilada (U), era o resultado esperado, já que a amostra utilizada (MCF7) era hipermetilada pela análise de MSP qualitativa. Entretanto, o sinal de fluorescência detectado com o uso do par de *primers* U mostrou a formação de dímeros de *primers*, um artefato que pode levar a falsos-positivos nos ensaios de qMSP. Para resolver este problema, novas reações com este par de oligonucleotídeos foram testadas utilizando-se concentrações menores de *primers* visando a eliminação deste artefato, o que foi obtido com a concentração de 60nM.

Após a escolha da concentração ideal dos *primers*, foi preciso realizar uma curva de amplificação para analisar a eficiência de cada um dos três pares. Essa curva é realizada fazendo uma série de diluições para que os *primers* possam ser utilizados na análise da quantificação. Como dito anteriormente, a proporção de diluição foi de 1:5 e a concentração inicial de DNA foi de 15ng. Como obtivemos eficiências aceitáveis: 90,4% para o *primer* N, 107,7% para o *primer* M e 109,4% para o *primer* U pode-se realizar o ensaio final para analisar o padrão de metilação das linhagens, lembrando que resultados entre 90 e 110% estão no intervalo de valores aceitáveis. Outros valores importantes para a aceitação ou não da eficiência são o valor de *slope* e o valor de R^2 . O valor de *slope* se refere à inclinação da curva padrão e o valor ideal é de -3,32, porém variações de até 10% acima ou abaixo também são aceitáveis. Os *slopes* mais negativos

(como -3,57) indicam reações com eficiência menor que 100%. Já *slopes* significativamente mais positivos que -3,32 podem indicar má qualidade da amostra ou problemas de pipetagem. O valor de R^2 , chamado coeficiente de correlação, precisa apresentar um valor $>$ ou igual a 0,99 e é um fator importante para indicar erros de pipetagem e erros entre as replicatas. Como todos os valores obtidos para os três pares de *primers* foram aceitáveis, foi possível a realização do ensaio seguinte utilizando as linhagens para análise do padrão de metilação.

As figuras 15, 16 e 17 ilustram o perfil de amplificação com as linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3, além de amostras hipometilada e hipermetilada. A curva de amplificação com o *primer* N (normalizador) representada pela figura 15 demonstra amplificação de todas as amostras, tanto a hipermetilada quanto a hipometilada. Isso confirma que esse *primer*, que se anela em uma região onde não há dinucleotídeos CpGs, não distingue sequências metiladas de não metiladas. A figura 16 apresenta a amplificação com o *primer* M (para sequências metiladas) e também mostra o resultado esperado, uma vez que a amostra hipometilada não foi amplificada. A figura 17 mostra que a amplificação com o *primer* U (para sequência não metilada) também ocorreu como o esperado. Houve amplificação da amostra hipometilada, mas a amostra hipermetilada não apresentou amplificação com as curvas referentes às linhagens apresentando apenas o excesso de primers não consumidos durante a reação devido à falta de DNA molde não metilado nestas linhagens. O ensaio utilizando as linhagens MDA-MB-134 e MDA-MB-453 está representado pelas figuras 18, 19 e 20. Esse ensaio, diferentemente do primeiro ensaio (figuras 15,16 e 17), não apresentou o resultado esperado. A amplificação referente ao *primer* normalizador mostrou amplificação apenas da linhagem MDA-MB-134. Para o *primer* M, houve amplificação das linhagens MDA-MB-134 e MDA-MB-453 e ausência de amplificação para a

amostra hipometilada. A falha foi em relação à amostra hipermetilada, que não apresentou amplificação. A curva referente ao *primer* U (figura 20) também apresentou falha, uma vez que não aconteceu amplificação da amostra hipometilada. A falha pode ter acontecido devido a erros de pipetagem ou à degradação e má qualidade das amostras de DNA modificados pelo bissulfito. Infelizmente, não foi possível a repetição da segunda análise por falta de tempo hábil para isso. Porém, tais ensaios serão futuramente repetidos para novas análises.

CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível confirmar a presença de hipermetilação da região promotora do gene *RASSF1* nas linhagens MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, MDA-MB-134 e SKBR3 pela metodologia de MSP e das linhagens MCF7, MDA-MB-231 e SKBR3 pela técnica de qMSP. As etapas cumpridas visando à otimização da técnica de qMSP foi de extrema importância para o laboratório, visto que será largamente utilizada para a realização de projetos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAI Z, GUST R. Breast cancer, estrogen receptor and ligands. Arch Pharm (Weinheim). 342: 13-149, 2009.
- BAKER LA, ALLIS CD, WANG GG. PHD fingers in human diseases: Disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. Mutat Res: Fundam Mol Mech Mutagen. Mutat Res. 647(1-2):3-12, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009. (disponível em <http://www.inca.gov.br>)
- BURBEE DG, FORGACS E, MÜLLER SZ, SHIVAKUMAR L, FONG K, GAO B, RANDLE D, KONDO M, VIRMANI A, BADDER S, SEKIDO Y, LATIF F, MILCHGRUB S, TOYOOKA S, GAZDAR AS, LERMAN MI, ZABAROVSKI E, WHITE M, MINNA JD. Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression. J Nat Cancer Inst 93: 691-99, 2001.
- CALDEIRA, J.R.; PRANDO, E.C.; QUEVEDO, F.C.; NETTO, F.A.M.; RAINHO, C.A.; ROGATTO, S.R. CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. BMC Cancer. 6:48-56 , 2006.

DI GIOIA S, BIANCHI P, DESTRO A, GRIZZI F, MALESCI A, LAGHI L, LEVRERO M, MORABITO A, RONCALLI M. Quantitative evaluation of RASSF1A methylation in the non-lesional, regenerative and neoplastic liver. BMC Cancer. 89(6), 2006.

ELLIS L, ATADJA PW, JOHNSTONE RW. Epigenetics in cancer: Targeting chromatin modifications. Mol Cancer 8(6): 1409-1420, 2009.

FUCITO A, LUCCHETTI C, GIORDANO A, ROMANO G. Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: What are the perspectives for clinical practice? Int J Biochem Cell Biol. 40: 565-575, 2008.

FUCITO A, LUCCHETTI C, GIORDANO A, ROMANO G. Genetic and epigenetic alterations in breast cancer: what are the perspectives for clinical practice? Int J Biochem Cell Biol. 40(4): 565-575, 2009.

GEYER FC, MARCHIO C, REIS FILHO JF. The role of molecular analysis in breast cancer. Pathology 41(1):77-88, 2009.

GLEICH LL, SALAMONE FN. Molecular genetics of head and neck cancer. Cancer Control 9(5):369-378, 2002.

HESSON, L.B.; COOPER, W.N.; LATIF, F. Evaluation of the 3p21.3 tumour-suppressor gene cluster. Oncogene. 26: 7283-7301, 2007.

HINSHELWOOD RA, CLARK SJ. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. *J Mol Med* 86:1315-1328, 2008.

HOSTETTER, C.L.; LICATA L.A.; KEEN J.C. Timing is everything: order of administration of 5-aza 2' deoxycytidine, trichostatin A and tamoxifen changes estrogen receptor mRNA expression and cell sensitivity. *Cancer Letters*. 275:178-184, 2009.

HU M, POLIAK K. Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J cancer* 44:2760-2765, 2008.

HULVAT MC, HANSEN NM, JERUSS JS. Multidisciplinary care for patients with breast cancer. *Surg Clin North Am* 89:133-176, 2009.

ITO M, ITO G, KONDO M, UCHIYAMA M, FUKUI T, MORI S, YOSHIOKA H, UEDA Y, SHIMOKATA K, SEKIDO Y. Frequent inactivation of RASSF1A, BLU, and SEMA3B on 3p21.3 by promoter hypermethylation and allele loss in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 225(1):131-9, 2005.

KARRAY-CHOUAYEKH, S.; TRIFA, F.; KHABIR, A.; BOUJELBANE, N.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; DAOUND, J.; FRIKHA, M.; JLIDI, R.; GARGOURI, A.; MOKDAD-GARGOURI, R. Aberrant methylation of *RASSF1A* is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 135, 2009, (Epub ahead of print).

KIOULAFA, M.; KAKLAMANIS, L.; MAVROUDIS, D.; GEORGOULIAS, V.; LIANIDOU, E.S. Prognostic significance of *RASSF1A* promoter methylation in operable breast cancer. *Clinical Biochemistry*. 42:970-975, 2009.

KRISTENSES LS, MIKESKA T, KRYPUY M, DOBROVIC A. Sensitive melting analysis after real time methylation specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res*. 36: 1-13, 2008.

KRISTENSEN LS, HANSEN LL. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem*. 55(8):1471-83, 2009.

LEE DY, HAYES JJ, PRUSS D, WOLFFE AP. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72(1): 73-84, 1993.

LEHMANN U, HASEMEIER B, LILISCHKIS R, KREIPE H. Quantitative analysis of promoter hypermethylation in laser-microdissected archival specimens. *Lab Invest*. 81(4):635-8, 2001.

LERESCU L, TUCUREANU C, CARAŞ I, NEAGU S, MELINCEANU L, SĂLĂGEANU A. Primary cell culture of human adenocarcinomas--practical considerations. *Roum Arch Microbiol Immunol*. 67(3-4):55-66, 2008.

LUGER K. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res* 14:5-16, 2006.

MANDELBLATT JS, CRONIN KA, BAILEY S, BERRY DA, DE KONING HJ, DRAISMA G, HUANG H, LEE SJ, MUNSELL M, PLEVritis SK, RAVDIN P, SCHECHTER CB, SIGAL B, STOTO MA, STOUT NK, VAN RAVESTEYN NT, VENIER J, ZELEN M, FEUER EJ. Effects of mammography screening under different screening schedules: model estimates of potential benefits and harms. *Ann Intern Med.* 17;151(10):738-47, 2009.

MENDEZ R, APTSIAURI N, DEL CAMPO A, MALENO I, CABRERA T, RUIZ-CABELLO F, GARRIDO F, GARCIA-LORA A. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother.* 58(9):1507-15, 2009.

NAIR PN, MCARDLE L, CORNELL J, COHN SL, STALLINGS RL. High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene. *Cancer Genet Cytogenet.* 174(2):100-10, 2007.

NEGRAES, P.D.; FAVARO, F.P.; CAMARGO, J.L.; OLIVEIRA, M.L.; GOLDBERG, J.; RAINHO, C.A.; SALVADORI, D.M. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC Cancer.* 8:238-249, 2008.

NUMOTO K, YOSHIDA A, SUGIHARA S, KUNISADA T, MORIMOTO Y, YONEDA Y, FUJITA Y, NISHIDA K, OUCHIDA M, OZAKI T. Frequent methylation of RASSF1A in synovial sarcoma and the anti-tumor effects of 5-aza-

20-deoxycytidine against synovial sarcoma cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 [Epub ahead of print].

PARK YJ, LUGER K. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem Cell Biol* 84(4):549-558, 2006.

PARL FF, DAWLING S, ROODI N, CROOKE PS. Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. *Ann N Y Acad Sci*. 1155: 68–75, 2009.

PAULIN R, GRIGG G W, DAVEY MW. Urea Improves Efficiency of Bisulfite-Mediated Sequencing of 5´methylcytosine in Genomic DNA. *Nucleic Acid Res* 26: 5009-10, 1998.

PÉREZ-LOPÉZ FR, CHEDRAUI P, HAYA J. Vitamin D acquisition and breast cancer risk. *Reprod Sci* 16:7-19, 2009.

PFEIFER GP, DAMMANN R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* 70(5): 576-83, 2005.

PIANTINO CB, SOUSA-CANAVEZ JM, SROUGI V, SALVADORI F, KATO R, AYRES PP, SROUGI M, CAMARA-LOPES LH, GATTÁS GJ, FRIDMAN C, DE TOLEDO F, SANTANA I, LEITE KR. Establishment and characterization of human bladder cancer cell lines BexBra1, BexBra2, and BexBra4. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2009.

- PRYZBYLKOWSKI, P.; OBAJIMI, O.; KEEN, J.C. Trichostatin A and 5 Aza-2'-deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. *Breast Cancer Res Treat.* 111(1): 15-25, 2007.
- RICHTER AM, PFEIFER GP, DAMMANN RH. The RASSF proteins in cancer: from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1796:114-128, 2009.
- RIVENBARK, A.G.; JONES, W.D.; RISHER, J.D.; COLEMAN, W.B. DNA methylation-dependent epigenetic regulation of gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Epigenetics.* 1:32-44, 2006.
- SIEGMUND KD, LAIRD PW. Analysis of complex methylation data. *Methods.* 27(2):170-8, 2002.
- TADDEI A, ROCHE D, BICKMORE WA, ALMOUZNI G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO.* 6(6):520-4, 2005.
- TODD R, DONOFF RB, WONG DTW. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumour progression model. *J Oral Maxillofac Sur* 56:613-623, 1997.
- UMETANI N, DE MAAT MF, MORI T, TAKEUCHI H, HOON DS. Synthesis of universal unmethylated control DNA by nested whole genome amplification with phi29 DNA polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1;329(1):219-23, 2005.

VAN DER WEYDEN L, ARENDS MJ, DOVEY OM, HARRISON HL, LEFEBVRE G, CONTE N, GERGELY FV, BRADLEY A, ADAMS DJ. Loss of RASSF1a cooperates with Apc(Min) to accelerate intestinal tumorigenesis. *Oncogene*. 24;27(32):4503-8, 2008.

VAN STAVEREN WC, SOLÍS DY, HÉBRANT A, DETOURS V, DUMONT JE, MAENHAUT C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta*. 1795(2):92-103, 2009.

WHANG YM, PARK KH, JUNG H, JO UH, KIM YH. Microtubule-damaging agents enhance RASSF1A-induced cell death in lung cancer cell lines. *Cancer* 115(6):1253-1266, 2009.

WORSHAM MJ, CHEN KM, MEDURI V, NYGREN AOH, ERRAMI A, SCHOUTEN JP, BENNINGER MS. Epigenetics events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Sur*. 132(6):668-677, 2006.

YAN, P.S.; SHI, H.; RAHMATPANAHI, F.; HSIAU, T.H.-C.; HSIAU, A.H.-A.; LEU, Y.W.; LIU, J.C.; HUANG, T.H.M. Differential Distribution of DNA Methylation within the RASSF1A CpG Island in Breast Cancer. *Cancer Res*. 63:6178-6186, 2003.

YAZICI, H.; TERRY, M.B.; CHO, Y.H.; SENIE, R.T.; LIAO, Y.; ANDRULIS, I.;
SANTELLA, R.M. Aberrant methylation of *RASSF1A* in plasma DNA before
breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 18:10-12, 2009.

ZHANG Y, LI M, WANG H, FISHER WE, LIN PH, YAO Q, CHEN C. Profiling of 95
microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time
PCR analysis. *World J Surg.* 33(4):698-709, 2009.